

УДК 577.355; 577.115.3

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ МИКРОВОДОРОСЛИ *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047

© 2021 В.В. Птушенко^{1,2*}, Г.Н. Бондаренко³, Е.Н. Виноградова^{4,5}, Е.С. Глаголева⁴,
О.В. Карпова⁴, О.С. Птушенко⁴, А.Е. Соловченко⁴, Б.В. Трубицин⁶,
О.Б. Чивкунова⁴, К.А. Шибзухова⁴, П.Н. Щербаков⁴

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: ptush@belozersky.msu.ru

² Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.09.2021

После доработки 04.11.2021

Принята к публикации 10.11.2021

Фотосинтезирующие организмы обладают рядом механизмов для предотвращения фотоокислительных реакций, инициированных в фотосинтетическом аппарате (ФСА) избыточным освещением. Причиной развития фотоокислительных реакций может служить не только увеличение интенсивности освещения, но и другие стрессовые воздействия, в частности, действие низких положительных температур. В настоящей работе мы исследовали индукцию фотозащитных механизмов у инкубируемой при пониженной освещённости (50 мкмоль фотонов \times м⁻² \times с⁻¹) зеленой почвенной микроводоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 после воздействия температуры 0 °С в течение 4 сут. Мы наблюдали снижение фотохимической активности фотосистемы II (ФСII) и эффективности фотосинтетического транспорта электронов на фоне существенного увеличения теплового рассеяния в фотосинтетической антенне поглощённой световой энергии. При этом большинство параметров, отражающих акклимацию ФСА к избыточному освещению (содержание хлорофилла и каротиноидов, доля пигментов виолаксантинового цикла в общем пуле каротиноидов и уровень их деэпоксидации, соотношение содержания фотосинтетических антенн и комплексов ФСII и фотосистемы I (ФСI)), практически не изменилось. Изменений в содержании основных ненасыщенных жирных кислот, кроме арахидоновой, также выявлено не было; концентрация последней возросла на 40%, что может способствовать активации виолаксантиндеэпоксидазы. Уровень экспрессии защитного белка LhcSR повышался в 4–7 раз по сравнению с его уровнем непосредственно перед началом низкотемпературной акклимации клеток. Предварительная инкубация клеток при +5 °С оказывала положительный эффект на показатели фотохимической активности ФСА при последующем действии температуры 0 °С. Полученные данные показывают, что акклимация *L. incisa* IPPAS C-2047 в течение 4 сут. к низкой положительной температуре на фоне низкой плотности светового потока приводит к формированию адаптивной реакции ФСА, отчасти характерной для условий светового стресса. Основным механизмом защиты ФСА в этих условиях является белок (LhcSR)-зависимое тушение возбуждения в фотосинтетической антенне.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: световой стресс, низкотемпературная акклимация, десатурация жирных кислот, арахидоновая кислота, тепловая диссипация энергии света, LhcSR, микроводоросли.

DOI: 10.31857/S0320972521120095

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтезирующие организмы характеризуются наличием эффективной системы погло-

щения энергии света для осуществления энергоакцепторных биохимических реакций [1–4], однако поглощение избыточной энергии света может инициировать фотоокислительные реак-

Принятые сокращения: АК – арахидоновая кислота; Ант – антраксантин; ВДЭ – виолаксантиндеэпоксидаза; ВАЗ – пигменты виолаксантинового цикла (Вио, Ант, Зеа); Вио – виолаксантин; ЖК – жирные кислоты; Зеа – зеаксантин; Кар – каротиноиды; Лют – лютеин; НЖК – ненасыщенные жирные кислоты; НФТ – нефотохимическое тушение; СБМ – сухая биомасса; ФСII (ФСI) – фотосистема II (I); ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл; DE – коэффициент деэпоксидации.

* Адресат для корреспонденции.

ции в фотосинтетическом аппарате (ФСА), приводящие к повреждению организма [5]. Для предотвращения их развития фототрофы выработали ряд защитных механизмов. Важнейшим механизмом защиты ФСА от светового стресса является тушение возбужденных форм хлорофилла с рассеянием энергии в виде тепла. Этот процесс сопровождается легко детектируемым снижением интенсивности флуоресценции хлорофилла, поэтому его часто называют также нефотохимическим тушением флуоресценции (НФТ). Ключевыми детерминантами НФТ являются состав и содержание пигментов, в первую очередь, дезэпоксицианированных форм ксантофиллов (зеаксантина, Зеа, и лютеина, Лют [6, 7]), а также содержание фотопротекторного белка LhcSR, родственного белкам светособирающей антенны. Этот белок присутствует преимущественно у низших растений [8, 9]. У сосудистых растений он замещается своим функциональным аналогом – белком PsbS, являющимся компонентом фотосистемы II (ФСII), а у представителей промежуточных групп (из которых наиболее изученным является мох *Physcomitrella patens*) функционируют оба белка [10]. Показано, что содержание универсальных для растительного мира каротиноидов Лют, Зеа и Ант [11, 12], а также нескольких характерных для водорослей дополнительных дезэпоксицианированных ксантофиллов [13] коррелирует с индукцией НФТ, в то время как эпоксицианированный ксантофилл виолаксантин либо не участвует в НФТ [14], либо ингибирует его индукцию [15]. Получены доказательства непосредственного участия зеаксантина в НФТ как необходимого фотохимического компонента [16], хотя в некоторых работах высказываются сомнения в необходимости зеаксантина для индукции НФТ [17]. LhcSR может связывать зеаксантин и осуществлять как зеаксантин-зависимое, так и зеаксантин-независимое НФТ в фотосинтетической антенне [18]. Нарушение экспрессии LhcSR в результате мутагенеза приводит к заметному снижению НФТ и жизнеспособности клеток при интенсивном освещении [8].

НФТ служит механизмом «быстрого реагирования» ФСА на световой стресс. На более длительных промежутках времени в процесс акклимации организма к избыточному освещению включаются и другие механизмы. К ним относятся изменения в соотношении пигмент-белковых комплексов обеих фотосистем (ФС I и ФС II) и фотосинтетических антенных (светособирающих) комплексов (ССК), а также изменения общего содержания компонентов ФСА в клетке [19, 20]. Каротиноиды, в дополнение к упомянутой выше роли их дезэпоксицианированных

кислородсодержащих форм в обеспечении НФТ, способны дезактивировать активные формы кислорода, возникающие в ФСА в условиях избыточного освещения [21, 22]. Поэтому для растений характерно увеличение содержания каротиноидов по отношению к хлорофиллу при длительной акклимации к интенсивному свету [23–27].

Индукция механизмов защиты от избыточного освещения возникает не только в условиях высокой инсоляции. В неблагоприятных условиях, снижающих интенсивность протекания метаболических процессов в организме, ФСА не в состоянии полностью утилизировать поглощаемую световую энергию, что также может привести к фотоокислительному повреждению клетки и организма [5]. К таким неблагоприятным условиям относится понижение температуры окружающей среды, вызывающее снижение текучести мембран клеток, подавляющее фотосинтетический метаболизм, и вовлечение продуктов ассимиляции в процессы роста и морфогенеза растения. В результате развивается световой стресс и ответ ФСА на него. При действии низких температур на фоне интенсивного освещения у растений отмечали накопление зеаксантина [28, 29]. Наряду с индукцией общих фотопротекторных реакций в ФСА, направленных на снижение возбуждения хлорофилла [30], происходит также специфическая акклимация организма к низкой температуре, в первую очередь, снижение вязкости мембраны за счёт десатурации жирных кислот (ЖК) мембранных липидов [31, 32]. До сих пор не до конца ясно, какова роль общих фотопротекторных и специфических для условий низкой температуры реакций фототрофного организма на условия светового стресса, спровоцированного понижением температуры. Очевидно, это зависит от вида самого организма (видоспецифичность), а также от интенсивности и продолжительности воздействия стрессовых факторов.

Удобной моделью для исследования этого вопроса может служить факультативная психрофильная микроводоросль *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047. Штамм был изолирован из почв Дальнего Востока России. Климат региона характеризуется существенными сезонными изменениями интенсивности инсоляции, температуры, формированием снежного покрова. Микроводоросли данного таксона были отмечены также на заснеженных горных склонах [33]. Учитывая характеристики мест распространения этой водоросли, можно ожидать высокую физиологическую пластичность их клеток, способность адаптироваться к резким изменениям условий обитания и формировать специфичес-

кие механизмы защиты ФСА от стрессовых воздействий.

Существенную роль в этих механизмах, согласно исследованиям последних лет, играют синтез и накопление полиненасыщенных ЖК, а также каротиноидных пигментов виолаксантинового цикла [34]. Более того, эти две компоненты (специфическая и неспецифическая) ответа на стресс, по-видимому, оказываются функционально связанными друг с другом. Ранее один из авторов этой работы высказал предположение, что образование и накопление одной из полиненасыщенных ЖК – арахидоновой кислоты (АК) – не только приводит к понижению вязкости мембраны, но и способствует повышению активности мембранного фермента виолаксантиндеэпоксидазы (ВДЭ) за счёт создания подходящего липидного микроокружения [34]. В свою очередь, ВДЭ обеспечивает относительно быстрое (в минутной шкале времени) образование антераксантина и зеаксантина, участвующих в НФТ, из предшественника виолаксантина. Однако пока остаётся неясным, является ли решающим фактором активация синтеза АК в клетке в ответ на понижение температуры или же достаточно её постоянного присутствия в клетке. Неясно также, за какие характерные времена происходит индукция НФТ и других фотопротекторных механизмов и какие из перечисленных выше механизмов играют наиболее существенную роль при акклимации микроводорослей к низкой температуре в течение нескольких суток.

В настоящей работе была поставлена цель выяснить, какую роль играют перечисленные выше механизмы защиты ФСА в акклимации микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 к низкой температуре за времена порядка нескольких суток. Для этого необходимо было решить следующие задачи: 1) охарактеризовать активацию НФТ и изменения активности ФСА микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 в результате акклимации к низкой температуре; 2) определить изменения пигментного состава и соотношения содержания пигмент-белковых комплексов ФСА, которые влияют на активность НФТ; 3) оценить изменение активности защитного белка LhcSR, ответственного за индукцию НФТ; 4) выяснить характерные изменения содержания ненасыщенных ЖК (НЖК) в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 при действии низкой температуры. Время наблюдения, 4 сут., было выбрано малым по сравнению с характерной длительностью экспоненциальной фазы роста культуры, но достаточным для индукции всех рассмотренных механизмов акклимации. Полученные результаты позволяют утверждать, что в наших условиях основным защитным механиз-

мом служит белок (LhcSR)-зависимое НФТ, а среди НЖК наиболее существенно возрастает содержание АК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования микроводорослей и отбор проб. В качестве модельного объекта была выбрана *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 – почвенная зелёная микроводоросль из класса Trebouxiophyceae (Chlorophyta). Суспензионную культуру микроводорослей объёмом 600 мл выращивали в фотобиореакторе в 0,7-литровой стеклянной колонне (внутренний диаметр 45 мм) при температуре 25–26 °С, постоянном барботировании среды отфильтрованным атмосферным воздухом и непрерывном освещении (50 мкмоль фотонов × м⁻² × с⁻¹) светодиодами панелями, оснащёнными нейтральными белыми светодиодами SMD 2835 («Arlight», Россия). По достижении оптической плотности OD₆₇₈ = 0,4–0,5 производили отбор проб культуры для проведения физиологического и биохимического анализов, затем культуру охлаждали до 0 °С со скоростью 0,4–0,8 °С/мин. Инкубацию при температуре около 0 °С продолжали в течение следующих 4 сут., после чего снова проводили отбор проб. Одновременно отбирали пробы из контрольной культуры, не подвергавшейся воздействию низкой температуры.

Для другой части экспериментов культуру сначала охлаждали до 5 °С и инкубировали при 5 °С в течение 4 сут., затем охлаждали до 0 °С и инкубировали при 0 °С ещё 4 сут., после чего проводили отбор проб. Пробы для биохимического анализа подвергали центрифугированию для осаждения клеток, полученный осадок замораживали при –80 °С и использовали затем для измерений (кроме измерений фотохимической активности ФСА). Для термостатирования культуры использовали охлаждающую циркуляционную баню-термостат SC100/A10 («Thermo Fisher Scientific», США), сопряжённую с культивационной колонной с помощью тонкого (не мешающего освещению культуры) змеевика, погружённого в суспензионную культуру.

Измерение фотохимической активности фотосинтетического аппарата и теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне. Указанные измерения выполняли непосредственно после отбора проб с помощью ЛР-теста [35] на импульсно-модулированном хлорофилл-флуориметре Fluor Pen FP 100 («Photon Systems Instruments», Чехия). Суспензию помещали в кварцевую кювету и адаптировали к темноте в течение 5 мин при 0 или 25 °С (для опытных и

контрольных образцов соответственно), после чего проводили измерение. Фотохимическую активность ФСА оценивали с помощью параметров F_v/F_m и ET_0/RC , характеризующих максимальную квантовую эффективность разделения зарядов в ФСII и интенсивность транспорта электронов в расчёте на один реакционный центр ФСII соответственно. Интенсивность теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне в расчёте на один реакционный центр оценивали с помощью параметра DI_0/RC [35].

Измерение сухой биомассы (СБМ). В ходе культивирования гравиметрически выполняли измерение СБМ. Клеточную суспензию (2–3 мл) осаждали на стекловолоконных фильтрах GF/F диаметром 25 мм («Whatman», США), предварительно высушенных в микроволновой печи до постоянной массы. Фильтры с осаждёнными клетками повторно высушивались. СБМ клеток в образце определяли как разность массы фильтра до и после осаждения клеток.

Измерение содержания хлорофилла и каротиноидов, анализ профиля жирных кислот. Состав жирных кислот суммарных липидов анализировали методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A («Agilent Technologies», США), оснащенного капиллярной колонкой HP5MS UI, соединенной с масс-селективным детектором Agilent 5970 («Agilent Technologies»). Экстракцию липидов проводили согласно методу Фолча [36]. Осажденную клеточную суспензию гомогенизировали в смеси хлороформ : метанол (2 : 1) с предварительным охлаждением в жидком азоте. Внутренний стандарт – 50 мкг маргариновой кислоты («Sigma», США) – добавляли в экстракты перед трансметилированием. Трансметилирование жирных кислот липидов проводили путем инкубации с 2%-ной серной кислотой в метаноле [37]. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах (вес. %) от суммарного содержания в пробе.

Содержание пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, суммарные каротиноиды) определяли в хлороформном экстракте спектрофотометрически. Регистрацию спектров поглощения экстрактов пигментов проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis («Agilent Technologies»). Концентрацию хлорофиллов и каротиноидов рассчитывали по уравнениям согласно работе [38].

Анализ состава каротиноидов методом ВЭЖХ. Замороженный осадок клеточной суспензион-

ной культуры растирали в ацетоне, осаждали центрифугированием. Супернатант, содержащий экстракт хлорофиллов и каротиноидов из клеток микроводорослей, инкубировали в течение 30 мин при 0 °С и непрерывном перемешивании с хроматографическим сорбентом Ambersep 900 («Merck», Германия) для омыления хлорофилла [39]. Обработанный таким образом экстракт анализировали с помощью хроматографа Smartline («Knauer», Германия) с каротиноидной колонкой YMC30, идентификацию осуществляли на основе хроматографических стандартов («CaroteNature», Швейцария). Определяли содержание каждого каротиноида по отношению к общему содержанию каротиноидов, в том числе суммарное содержание пигментов виолаксантинового цикла (ВАЗ):

$$ВАЗ = \text{Вио} + \text{Ант} + \text{Зеа}. \quad (1)$$

Коэффициент дезоксидации пула ВАЗ рассчитывали по формуле:

$$DE = (Зеа + 0,5 \times \text{Ант}) / (Зеа + \text{Ант} + \text{Вио}). \quad (2)$$

Измерение содержания ФСI. Осадок клеточной суспензионной культуры ресуспендировали в дистиллированной воде, помещали суспензию в пластиковую (TFE) трубку и регистрировали спектр электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с помощью спектрометра ЭПР 3-сантиметрового диапазона Varian-E4 («Varian», США) в темноте и при освещении интенсивным (1500 мкмоль фотонов \times $m^{-2} \times c^{-1}$) белым светом, который позволял полностью окислить реакционные центры ФСI. Измеряли светозависимый сигнал ЭПР с g-фактором 2,0023 и шириной около 0,9 мТл, известный в литературе как сигнал ЭПР1, который соответствует окисленному первичному донору ФСI, $P700^+$ [40]. Оценивали содержание ФСI в суспензии на основании величины сигнала ЭПР1 при освещении. Для определения абсолютной концентрации ФСI определяли двойной интеграл сигнала ЭПР1 и сравнивали его с двойным интегралом спектра спиновой зонда TEMPOamine, записанного при тех же настройках резонатора ЭПР-спектрометра.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени. Суммарная РНК была выделена из клеток с помощью набора GeneJet Plant RNA purification («Thermo Fisher Scientific») или RNeasy Mini («Qiagen», Германия). Замороженный осадок клеточной суспензионной культуры (~ 100 мг) растирали в жидком азоте либо измельчали в гомогенизаторе Fastprep-24 5g («MP Biomedicals», США) со скоростью 6 м/с в тече-

ние 40 с в лизирующем буфере с гранулами типа А («MP Biomedicals»). Клеточный лизат осветляли центрифугированием (10 000 g, 10 мин) и далее осуществляли процедуру выделения РНК в соответствии с протоколом производителя. Синтез одноцепочечной кДНК проводили с использованием набора для обратной транскрипции Maxima 1-st strand cDNA («Thermo Fisher Scientific») или MMLV RT с обратной транскриптазой Mint («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для синтеза кДНК использовали 250 нг РНК каждого из образцов. Полученную кДНК хранили при -20°C .

Подбор праймеров был выполнен с использованием программного обеспечения RealTime PCR Tool («Integrated DNA Technologies», США), доступного по ссылке <https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>, с параметрами по умолчанию в контигах собранного *de novo* генома *L. incisa* IPPAS C-2047, предположительно содержащих целевые гены. Присутствие целевых генов было установлено на основании выравнивания контигов из собранного *de novo* генома *L. incisa* IPPAS C-2047 с целевыми генами близкородственных водорослей (BLAST NCBI).

ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили с использованием амплификатора QuantStudio 7 Flex («Applied Biosystems», США) или Agilent AriaMx Real-time PCR System («Agilent Technologies») и набора для qPCR QuantiTect SYBR Green («Qiagen») или qPCRmix-HS SYBR («Евроген») в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа результатов использовали онлайн-приложение «Thermo Fisher Scientific» для приборов серии «QuantStudio». Содержание специфических транскриптов рассчитывали относительно уровня актина и убиквитинлигазы (эндогенный контроль) в той же культуре до начала низкотемпературной акклимации.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены с трёхкратной биологической повторностью. ЛП-тест и ПЦР в реальном времени выполнены с трёхкратной, остальные измерения – с двукратной аналитической повторностью. Все результаты представляют среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). Усреднение проводили сначала по аналитическим, затем по биологическим повторностям. SD оценивали по разбросу биологических повторностей, т.к. он существенно превосходил разброс между аналитическими. Достоверность отличия изменений измеряемых параметров от единицы оценивали на основе доверительных интервалов для математического

ожидания нормальной выборки с уровнем доверия $p = 95\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе работы была выполнена оценка показателей активности ФСА (фотохимическая активность ФСП, эффективность фотосинтетического транспорта электронов и теплового рассеяния поглощённой световой энергии), а также характеристик ФСА, связанных с акклимацией к избыточному освещению (содержание разных форм хлорофилла и каротиноидов, в том числе уровень дезоксидации пула ксантофиллов, а также уровень экспрессии гена *LhcSR*). Также был выполнен анализ содержания НЖК в клетке. Измерения были выполнены непосредственно перед и через 4 сут. после начала непрерывной акклимации к 0°C ; далее везде приведено изменение каждого показателя в результате акклимации по отношению к состоянию до акклимации.

Время, в течение которого культуру клеток подвергали воздействию низкой температуры, было выбрано достаточно большим, чтобы дать возможность проявиться всем исследуемым в работе механизмам акклимации. Тем не менее оно является меньшим, чем характерная длительность экспоненциальной фазы роста суспензионной культуры клеток *L. incisa* IPPAS C-2047 для минимизации влияния роста культуры на измеряемые параметры. Изменение СБМ контрольной суспензии за время наблюдения составляло $(30 \pm 12)\%$. В то же время рост опытной суспензии был существенно замедлен, или даже происходила незначительная потеря биомассы, и в среднем за время наблюдения изменений СБМ не наблюдалось, значения прироста СБМ составляли $(0 \pm 20)\%$.

Кроме того, были получены культуры клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, охлаждённые до 0°C не сразу, а предварительно инкубированные при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ в течение 4 сут. В этом случае для описания изменений состояния ФСА в результате акклимации к 0°C также использовали отношение каждого показателя в конце акклимации к его значению непосредственно перед началом охлаждения.

Характеристики культуры перед охлаждением приведены в таблице.

Активность фотосинтетического аппарата. К концу 4-х сут. инкубации суспензии при температуре 0°C наблюдалось снижение фотохимической потенциальной активности ФСП, F_v/F_m , приблизительно в 2 раза по сравнению с исходной активностью (рис. 1). При этом квантовый выход фотоиндуцированного транспор-

Характеристики суспензионной культуры *L. incisa* IPPAS C-2047 перед началом охлаждения

СБМ (мг/мл)	$0,61 \pm 0,38$
F_v/F_m	$0,50 \pm 0,05$
DI_0/RC	$2,9 \pm 0,7$
ET_0/RC	$0,82 \pm 0,24$
НЖК (% от суммарных ЖК)	
18 : 1	17 ± 2
18 : 2	21 ± 5
18 : 3	11 ± 5
20 : 4	11 ± 4
Хл и Кар	
Хл/СБМ	$0,018 \pm 0,006$
Кар/Хл	$0,53 \pm 0,05$
Лют/Кар	50 ± 11
ВАЗ/Кар	38 ± 10
DE	21 ± 11

Примечание. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6-8$).

та электронов, ET_0/RC , падал ещё более значительно. Эти изменения сопровождались возрастанием теплового рассеяния поглощённой энергии света в фотосинтетической антенне, DI_0/RC , в 4 раза. Необходимо подчеркнуть, что все эти характеристики были измерены на клетках, адаптированных к темноте. Иными словами, они не связаны с динамической, индуцируемой светом активацией теплового рассеяния световой энергии, а представляют собой постоянный (длительно релаксирующий) компонент защиты ФСА, сформировавшийся в ходе акклимации к низкой температуре. При этом в контрольной суспензии, постоянно инкубируемой при температуре $25^\circ C$, значения F_v/F_m , ET_0/RC и DI_0/RC оставались практически неизменными в течение того же времени (рис. 2).

Состав пигментов и содержание пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата. Большинство параметров, отражающих акклимацию ФСА к избыточному освещению, остались практически неизменными. Так, общее содержание хлорофилла в клетках в расчёте на единицу сухого веса, Chl/DW , через 4 сут. инку-

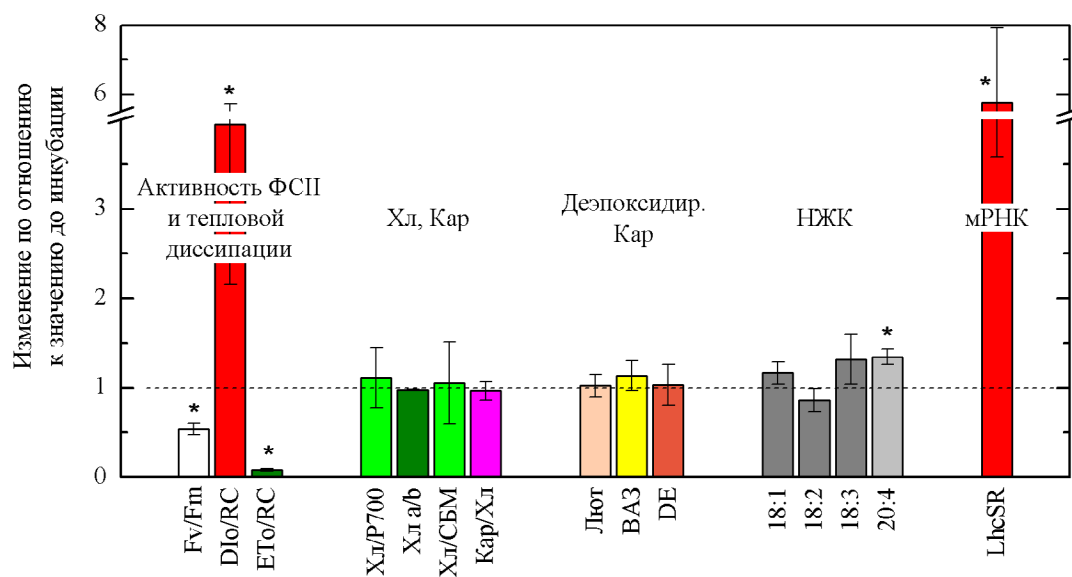


Рис. 1. Изменение показателей теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне (DI_0/RC) и фотохимической активности ФСП (F_v/F_m и ET_0/RC), содержания и состава хлорофилла, каротиноидов и ненасыщенных жирных кислот (НЖК), а также активности экспрессии LhcSR в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 в результате акклимации к температуре $0^\circ C$ (значение каждого параметра перед началом низкотемпературной акклимации принято за единицу). $X_{л}/P700$ и $X_{л}/СБМ$ – суммарное содержание хлорофилла (Хл) *a* и *b* в расчёте на содержание реакционных центров ФСИ (P700) или на сухую биомассу соответственно; Кар/Хл – содержание каротиноидов в расчёте на суммарное содержание Хл; $X_{л} a/b$ – соотношение содержания Хл *a* и *b*; Лют и ВАЗ – доля лютеина и пигментов виолаксантинового цикла среди всех каротиноидов соответственно. DE – коэффициент дезоксидации пула ВАЗ. 18 : *x* и 20 : 4 – доля соответствующих НЖК среди всего пула ЖК клетки. Горизонтальной пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий отсутствию изменений. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Звёздочки над столбцами указывают, что изменение соответствующего показателя в ходе акклимации клеток к низкой температуре достоверно отличается от единицы с уровнем доверия $p = 95\%$

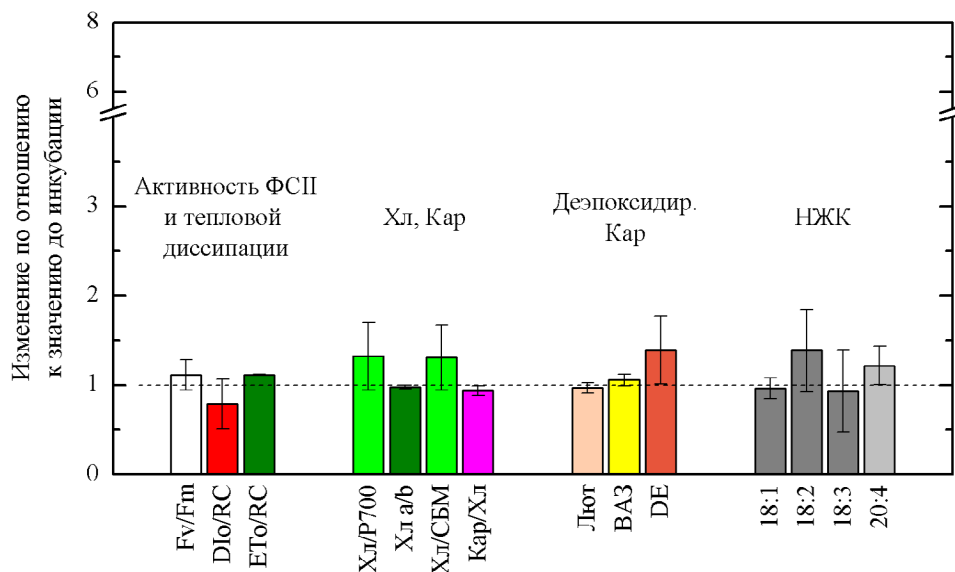


Рис. 2. Изменение показателей теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне и фотохимической активности ФСII, содержания и состава хлорофилла, каротиноидов и НЖК, а также активности экспрессии LhcSR в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 на 4-е сут. инкубации при нормальной температуре (25 °C) по сравнению с их значениями перед началом инкубации. Обозначения – как на рис. 1. Горизонтальной пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий отсутствию изменений. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$)

бации при низкой температуре оставалось на том же уровне, что и до начала низкотемпературной акклимации (рис. 1). Также не изменилось соотношение содержания хлорофилла *a* и *b*, Chl *a/b*, которое характеризует соотношение фотосинтетических антенн (преимущественно комплексов внешней антенны ФСII, ЛНСII) и комплексов ФСII и ФСI. Поскольку комплексы ЛНСII содержат значительно большую долю хлорофилла *b*, чем все остальные фотосинтетические пигмент-белковые комплексы [41], то вышеуказанное соотношение комплексов, как правило, служит маркером адаптации фотосинтезирующего организма к интенсивности освещения [42, 43]. Измерения содержания комплексов ФСI, сделанные на основе сигнала ЭПР полностью окисленного первичного донора ФСI, P700, также не показали достоверных изменений содержания ФСI по отношению к общему содержанию хлорофилла, Chl/P700. Таким образом, как общее содержание ФСА в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047, так и соотношение ключевых фотосинтетических комплексов ФСI, ФСII и ЛНСII оказалось нечувствительным к низкотемпературной акклимации выбранной нами продолжительности.

Неизменным оставалось и общее содержание каротиноидов в расчёте на хлорофилл (Car/Chl), изменение (как правило, рост) которого часто рассматривают в качестве одной из наиболее заметных реакций ФСА на условия

светового стресса [23, 44, 45]. Хроматографический анализ состава каротиноидов показал, что он также оказался нечувствительным к рассматриваемым нами стрессовым условиям. Так, ни содержание пигментов виолаксантинового пула (включающего виолаксантин, антераксантин и зеаксантин, VAZ), ни доля деэпоксицированных форм ксантофиллов среди пула VAZ, выражаемая коэффициентом деэпоксициации, DE, не проявляла достоверных изменений. Ещё одной фотопротекторной деэпоксицированной формой ксантофиллов, хотя и неспособной к быстрой конверсии в/из эпоксицированных предшественников, считают Лют [12]; однако изменений содержания Лют мы также не наблюдали.

В контрольной суспензии мы также не наблюдали достоверных изменений содержания и состава фотосинтетических пигментов, хотя можно заметить некоторую тенденцию к изменениям содержания хлорофилла и коэффициента деэпоксициации, что может быть обусловлено акклимацией к изменяющимся условиям роста из-за накопления биомассы и увеличения оптической плотности среды (рис. 2). Заметим, что, в отличие от контрольной суспензии, рост опытной суспензии практически отсутствует и не осложняет картину акклимации культуры к низкой температуре.

Экспрессия гена фотопротекторного белка LhcSR. Согласно общепринятому на нынешний

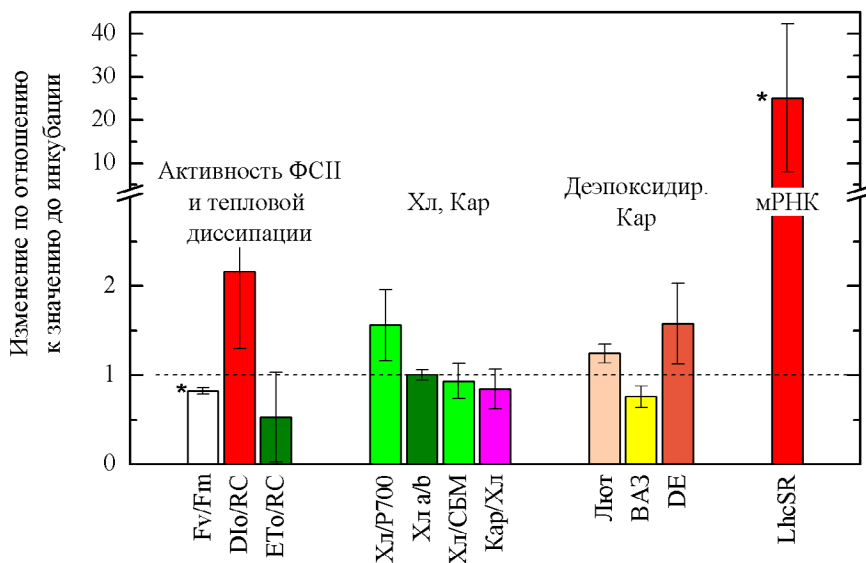


Рис. 3. Изменение показателей теплового рассеяния энергии света в фотосинтетической антенне и фотохимической активности ФСII, содержания и состава хлорофилла, каротиноидов и НЖК, а также активности экспрессии LhcSR в клетках *L. incisa* IPPAS C-2047 на 4-е сут. инкубации при низкой температуре (0 °C) после предварительной акклимации к 5 °C (опытная суспензия) по сравнению с их значениями перед началом инкубации при пониженной температуре. Обозначения – как на рис. 1. Горизонтальной пунктирной линией отмечен уровень, соответствующий отсутствию изменений. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Звёздочки над столбцами указывают, что изменение соответствующего показателя в ходе акклимации клеток к низкой температуре достоверно отличается от единицы с уровнем доверия $p = 95\%$

момент представлению, для низших растений ключевым компонентом защиты ФСА от избыточного освещения является LhcSR, вызывающий индукцию НФТ и принадлежащий к семейству хлорофилл-связывающих белков, подобных белкам антенны. Мы наблюдали существенный рост уровня экспрессии гена LhcSR в ходе низкотемпературной акклимации культуры клеток *L. incisa* IPPAS C-2047 (рис. 1), что свидетельствует в пользу накопления белка LhcSR в ФСА.

Изменение содержания ненасыщенных жирных кислот. Основную долю пула ЖК (до 60–70% в сумме), входящих в состав липидов *L. incisa*, составляют НЖК: олеиновая (18 : 1), линолевая (18 : 2), α - и γ -линоленовые кислоты (18 : 3), АК (20 : 4). Относительное (по отношению ко всему пулу ЖК) содержание АК в клетках заметно возросло (на 40%) в результате низкотемпературной акклимации, в то время как для других перечисленных ЖК достоверных изменений их относительного содержания в клетке не наблюдали.

Характеристики ФСА клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, предварительно акклимированных к 5 °C. В результате акклимации клеток к температуре 0 °C после их предварительной инкубации при 5 °C также наблюдалось снижение F_v/F_m и ET_0/RC , однако не столь драматическое (рис. 3).

Тепловое рассеяние световой энергии в фотосинтетической антенне, DI_0/RC , хотя и возросло, но тоже не столь значительно, как в случае быстрого охлаждения клеток до 0 °C. При этом, однако, наблюдалось возрастание коэффициента дезоксидации, DE, и более значительный рост уровня экспрессии гена LhcSR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фотоавтотрофная клетка обладает рядом механизмов, позволяющих ей снизить повреждающее действие избыточного освещения. В зависимости от условий (интенсивности стрессовых факторов, времени их действия и т.п.) разные механизмы могут включаться в общую защитную реакцию организма. У психротолерантной микроводоросли *L. incisa* IPPAS C-2047, исследуемой в настоящей работе, реакция ФСА на понижение температуры включала накопление АК и повышение уровня экспрессии гена LhcSR (которое, как можно предполагать, отражает рост содержания фотопротекторного белка LhcSR в хлоропластах *L. incisa*), но практически не затрагивала состав пигментов и пигмент-белковых комплексов ФСА. Наблюдаемые нами изменения характерны для ответа клетки на стрессовые воздействия, независимо от приро-

ды стрессового фактора, причём накопление АК характерно для *L. incisa*, а синтез LhcSR — для большинства изученных к настоящему времени зелёных водорослей (включая *Chlorophyta* и *Streptophyta*) и многих других таксономических групп водорослей [46]. LhcSR является одним из ключевых участников индукции НФТ у низших растений в ответ на стрессовые воздействия, причём его высокая активность достигается за счёт накопления белка путём значительного повышения активности транскрипции его гена [8]. LhcSR-зависимый ответ на стресс в ходе эволюции наземных растений был замещён PsbS-зависимым НФТ [9, 47].

Синтез АК происходит через реакцию десатурации её предшественника, дигомо- γ -линоленовой кислоты (20 : 3). Эта реакция активируется понижением температуры и лежит в русле общей реакции организма на низкую температуру — десатурации ЖК [48, 49]. Однако в *L. incisa* АК является компонентом не только структурных, но и запасных липидов, и накопление АК в *L. incisa* происходит в ответ на разнообразные стрессовые воздействия, препятствующие делению клеток и эффективному использованию световой энергии в ФСА [34]. В результате накопление АК и других запасных ЖК способствует разгрузке фотосинтетической цепи электронного транспорта на её акцепторной стороне и тем самым активирует фотохимическое тушение возбуждённого хлорофилла в фотосинтетической антенне (т.е. тушение за счёт активации фотохимической реакции разделения зарядов в реакционном центре ФСII). Следует отметить, что ранее было высказано предположение о том, что наряду с этим неспецифическим влиянием на устойчивость ФСА в условиях стресса АК в качестве структурного компонента тилакоидной мембраны способствует также повышению активности мембранного фермента виолаксантиндеэпоксидазы (ВДЭ) за счёт создания подходящего липидного микроокружения [34]. В свою очередь, ВДЭ обеспечивает относительно быстрое (в минутной шкале времени) образование каротиноида зеаксантина, одного из ключевых участников НФТ — универсального механизма защиты от избыточного освещения у оксигенных фототрофных организмов. Несмотря на то что мы не наблюдали заметного роста содержания зеаксантина в результате низкотемпературной акклимации, можно предположить, что «превентивное» повышение активности ВДЭ играет роль в быстром накоплении зеаксантина при более длительной акклимации к низкой температуре и (или) происходящих на фоне её всплесках интенсивности освещения.

Большинство реакций ФСА, участвующих в акклимации фотосинтетического организма к условиям светового стресса, не наблюдалось при низкотемпературной акклимации *L. incisa* IPPAS С-2047. Так, ни общее содержание ФСА (в расчёте на вес СБМ), ни соотношение разных пигмент-белковых комплексов ФСА (в том числе соотношение антенных комплексов и реакционных центров ФСII и ФСI, которое, как правило, является наиболее заметной реакцией фотосинтетической клетки на изменение доступности световой энергии) не претерпевали достоверных изменений. Можно предположить, что это связано с относительно низкой интенсивностью освещения ($50 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$), при которой происходила инкубация культуры клеток *L. incisa* в наших экспериментах. Свет такой интенсивности в благоприятных условиях не является стрессовым фактором и не вызывает повреждений ФСА или активации заметного НФТ [50]. Однако при охлаждении культуры клеток мы, несомненно, наблюдали световой стресс, о чём говорит как снижение фотохимической активности ФСII и квантового выхода фотоиндуцированного транспорта электронов (рис. 1, F_v/E_m и ET_0/RC), так и значительный рост теплового рассеяния поглощённой энергии света в фотосинтетической антенне (DI_0/RC). С другой стороны, данные условия действительно могут быть относительно «мягкими» для клеток водоросли, и использование лишь одного LhcSR-зависимого механизма акклимации ФСА (одновременно с характерной для низкой температуры десатурацией ЖК) может оказаться наиболее «экономным» способом приспособления клетки к стрессовым условиям. В самом деле, синтез LhcSR, хотя и менее эффективен по сравнению с эволюционно более поздним PsbS-зависимым НФТ, может обойтись гораздо «дешевле» для клетки, чем редукция всего ФСА или каких-то его компонентов (например, фотосинтетической антенны) с их последующим ресинтезом после прекращения действия стрессоров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инкубация микроводоросли *L. incisa* IPPAS С-2047 при низкой температуре ($0 \text{ }^\circ\text{C}$) приводит к существенному замедлению роста культуры. При неизменной интенсивности света это неизбежно должно сопровождаться снижением скорости расходования продуктов световых реакций фотосинтеза, перевосстановлением кофакторов фотосинтетической цепи переноса электронов, возрастанием времени жизни возбуждённых состояний хлорофилла в фотосинтетичес-

кой антенне. Такие изменения в ФСА характерны для светового стресса, т.е. реакции ФСА на избыточное освещение. Несмотря на относительно низкую интенсивность освещения ($50 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) при инкубации культуры микроводоросли в наших экспериментах, она проявляла некоторые характерные черты светового стресса при воздействии низкой температуры: снижение активности ФСII, рост НФТ, повышение уровня экспрессии гена LhcSR. Кроме того, происходило накопление АК, характерное для *L. incisa* при воздействии стрессовых факторов различной природы. В то же время при акклимации *L. incisa* IPPAS C-2047 к низкой температуре не наблюдалось заметных изменений в составе пигментов и пигмент-белковых комплексов ФСА, которые можно было бы ожидать в ответ на изменения интенсивности света при неизменной температуре.

Можно предположить наличие следующей стратегии ответа клетки на воздействие низкой ($0 \text{ }^\circ\text{C}$) температуры на фоне освещения низкой интенсивности. Изменение состава пигмент-белковых комплексов ФСА (в частности, редукция антенных комплексов ЛНСII) потребовало бы деградации значительной части белков ФСА при стрессе и их ресинтеза при последующей нормализации условий. Вместо этого более предпочтительным путём для клетки может быть сохранение основной массы белков ФСА в расчёте на их эффективное использование после нормализации условий, а обеспечение защиты ФСА — преимущественно за счёт синтеза лишь одного компонента ФСА, защитного белка (LhcSR), снижающего содержание возбуждённых состояний хлорофилла в фотосинтетической антенне. Такая стратегия может быть результативной в случае: i) высокой эффективности LhcSR-зависимого НФТ, не требующего «помощи» со стороны других механизмов, и ii) относительно непродолжительного воздействия стрессовых условий.

В связи с этим можно предположить возрастание роли других защитных механизмов в ходе более длительной акклимации культуры клеток *L. incisa* к низкой температуре. С другой стороны, высокая эффективность LhcSR-зависимого НФТ, позволяющая *L. incisa* хотя бы при относительно мягких стрессовых условиях обходиться без других, более «дорогостоящих» для клетки мер, может являться одной из тех адаптаций, которые обуславливают её толерантность к низкой температуре. Эти предположения отчасти подтверждаются нашими данными по индукции защитных механизмов у клеток, которые перед инкубацией при температуре $0 \text{ }^\circ\text{C}$ предварительно были акклимированы к $5 \text{ }^\circ\text{C}$ и у которых начинают проявляться и другие механизмы акклимации ФСА к низкой температуре.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00509).

Благодарности. Спектрофотометрические измерения были выполнены с использованием оборудования ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы благодарны В.А. Макарову и К.В. Скулачеву за помощь в техническом обеспечении работы, М.Д. Логачевой и Р.А. Зиновкину за советы и помощь с обеспечением реактивами и оборудованием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Osborne, B. A., and Raven, J. A. (1986) Light absorption by plants and its implications for photosynthesis, *Biol. Rev.*, **61**, 1-60.
- Croce, R., and Van Amerongen, H. (2014) Natural strategies for photosynthetic light harvesting, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 492-501.
- Walla, P. J., Holleboom, C.-P., and Fleming, G. R. (2014) Electronic carotenoid-chlorophyll interactions regulating photosynthetic light harvesting of higher plants and green algae, *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, Springer, p. 229-243.
- Amarnath, K., Bennett, D. I. G., Schneider, A. R., and Fleming, G. R. (2016) Multiscale model of light harvesting by photosystem II in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1156-1161.
- Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., and Adams, III, W. W. (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons, *Photosynth. Res.*, **113**, 75-88.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 1-24.
- García-Plazaola, J. I., Esteban, R., Fernández-Marín, B., Kranner, I., and Porcar-Castell, A. (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the Arabidopsis model, *Photosynth. Res.*, **113**, 89-103.
- Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., et al. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, **462**, 518-521.

9. Pinnola, A. (2019) The rise and fall of light-harvesting complex stress-related proteins as photoprotection agents during evolution, *J. Exp. Bot.*, **70**, 5527-5535.
10. Verhoeven, A. (2014) Sustained energy dissipation in winter evergreens, *New Phytologist*, **201**, 57-65.
11. Jahns, P., and Holzwarth, A. R. (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 182-193.
12. García-Plazaola, J. I., Matsubara, S., and Osmond, C. B. (2007) The lutein epoxide cycle in higher plants: its relationships to other xanthophyll cycles and possible functions, *Funct. Plant Biol.*, **34**, 759-773.
13. Lohr, M., and Wilhelm, C. (1999) Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8784-8789.
14. Gilmore, A. M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, *Physiol. Plant.*, **99**, 197-209.
15. Kaňa, R., Kotabová, E., Kopečná, J., Trsková, E., Belgio, E., et al. (2016) Violaxanthin inhibits nonphotochemical quenching in light-harvesting antenna of *Chromera velia*, *FEBS Lett.*, **590**, 1076-1085.
16. Holt, N. E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.-P., Niyogi, K. K., et al. (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting, *Science*, **307**, 433-436.
17. Johnson, M. P., and Ruban, A. V. (2011) Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced ΔpH, *J. Biol. Chem.*, **286**, 19973-19981.
18. Pinnola, A., Staleva-Musto, H., Capaldi, S., Ballottari, M., Bassi, R., et al. (2016) Electron transfer between carotenoid and chlorophyll contributes to quenching in the LHCSR1 protein from *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1870-1878.
19. Bonente, G., Pippa, S., Castellano, S., Bassi, R., and Ballottari, M. (2012) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5833-5847.
20. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J. B., Croce, R., and Boekema, E. J. (2013) High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 411-419, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.003.
21. Jørgensen, K., and Skibsted, L. H. (1993) Carotenoid scavenging of radicals, *Zeitschr. Lebensmittel Untersuchung Forschung*, **196**, 423-429.
22. Telfer, A., Dhimi, S., Bishop, S. M., Phillips, D., and Barber, J. (1994) Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers, *Biochemistry*, **33**, 14469-14474.
23. Lichtenthaler, H. K., Babani, F., Navrátil, M., and Buschmann, C. (2013) Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees, *Photosynth. Res.*, **117**, 355-366.
24. Demmig-Adams, B., and Adams, W. W. I. (1996) Chlorophyll and carotenoid composition in leaves of *Euonymus kiauutschovicus* acclimated to different degrees of light stress in the field, *Funct. Plant Biol.*, **23**, 649-659.
25. Aburai, N., Sumida, D., and Abe, K. (2015) Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae), *Algal Res.*, **8**, 30-36.
26. Solovchenko, A., Solovchenko, O., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Pal, D., et al. (2013) Probing the effects of high-light stress on pigment and lipid metabolism in nitrogen-starving microalgae by measuring chlorophyll fluorescence transients: studies with a Δ5 desaturase mutant of *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Algal Res.*, **2**, 175-182.
27. Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Recht, L., and Boussiba, S. (2011) Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids, *Marine Biotechnol.*, **13**, 527-535.
28. Zarter, C. R., Adams, W. W., Ebbert, V., Cuthbertson, D. J., Adamska, I., et al. (2006) Winter down-regulation of intrinsic photosynthetic capacity coupled with up-regulation of Elip-like proteins and persistent energy dissipation in a subalpine forest, *New Phytologist*, **172**, 272-282.
29. Zarter, C., Adams, W. W., Ebbert, V., Adamska, I., Jansson, S., et al. (2006) Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen *Arctostaphylos uva-ursi* as influenced by altitude and light environment, *Plant Cell Environ.*, **29**, 869-878.
30. Huang, W., Zhang, S.-B., and Cao, K.-F. (2010) The different effects of chilling stress under moderate light intensity on photosystem II compared with photosystem I and subsequent recovery in tropical tree species, *Photosynth. Res.*, **103**, 175-182.
31. Theocharis, A., Clément, C., and Barka, E. A. (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures, *Planta*, **235**, 1091-1105.
32. Los, D. A., Mironov, K. S., and Allakhverdiev, S. I. (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions, *Photosynth. Res.*, **116**, 489-509.
33. Watanabe, S., Hirabayashi, S., Boussiba, S., Cohen, Z., Vonshak, A., et al. (1996) *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Phycol. Res.*, **44**, 107-108.
34. Zorin, B., Pal-Nath, D., Lukyanov, A., Smolskaya, S., Kolusheva, S., et al. (2017) Arachidonic acid is important for efficient use of light by the microalga *Lobosphaera incisa* under chilling stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 853-868, doi: 10.1016/j.bbali.2017.04.008.
35. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., and Srivastava, A. (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, *Chlorophyll Fluorescence*, Springer, p. 321-362.
36. Folch, J., Lees, M., and Stanley, G. H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
37. Kates, M. (1986) *Techniques of Lipidology; Isolation, Analysis and Identification of Lipids*, 2nd Edn., Elsevier, Amsterdam.
38. Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, 307-313.
39. Larsen, E., and Christensen, L. P. (2005) Simple saponification method for the quantitative determination of carotenoids in green vegetables, *J. Agricul. Food Chem.*, **53**, 6598-6602.
40. Weaver, E. C. (1968) EPR studies of free radicals in photosynthetic systems, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **19**, 283-294.
41. Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R. C., and Santabarbara, S. (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **15**, 296-331.
42. Givnish, T. J. (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective, *Austr. J. Plant Physiol.*, **15**, 63-92.
43. Beneragama, C. K., and Goto, K. (2010) Chlorophyll a: b ratio increases under low-light in "shade-tolerant" *Euglena gracilis*, *Tropic. Agricult. Res.*, **22**, 12-25.
44. Virtanen, O., Khorobrykh, S., and Tyystjärvi, E. (2021) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to extremely strong light, *Photosynth. Res.*, **147**, 91-106.
45. Eismann, A. I., Reis, R. P., da Silva, A. F., and Cavalcanti, D. N. (2020) *Ulva* spp. carotenoids: Responses to environmental conditions, *Algal Res.*, **48**, 101916.

46. Giovagnetti, V., and Ruban, A. V. (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1263-1277.
47. Gerotto, C., and Morosinotto, T. (2013) Evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization: evidence of PSBS-dependent NPQ in late Streptophyte algae, *Physiol. Plant.*, **149**, 583-598.
48. Sakamoto, T., and Murata, N. (2002) Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress, *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 206-210.
49. Guschina, I. A., and Harwood, J. L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Progr. Lipid Res.*, **45**, 160-186.
50. Richardson, K., Beardall, J., and Raven, J. A. (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies, *New Phytol.*, **93**, 157-191.

THE EFFECT OF CHILLING ON THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF MICROALGA *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047

V. V. Ptushenko^{1,2*}, G. N. Bondarenko³, E. N. Vinogradova^{4,5}, E. S. Glagoleva⁴,
O. V. Karpova⁴, O. S. Ptushenko⁴, A. E. Solovchenko⁴, B.V. Trubitsin⁶,
O. B. Chivkunova⁴, K. A. Shibzukhova⁴, and P. N. Shcherbakov⁴

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: ptush@belozersky.msu.ru

² Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

³ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁵ National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

⁶ Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Photosynthetic organisms have developed a set of mechanisms aimed at preventing photo-oxidative reactions in the photosynthetic apparatus (PSA) initiated by excessively absorbed light energy. Along with high irradiance, other stressors, e.g., chilling temperatures can lead to the formation of the excess light energy and hence to photo-oxidative stress. The induction of photoprotective mechanisms in response to chilling (0 °C) at a low irradiance (50 μmol PAR photons × m⁻² × s⁻¹) in the microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 cells was studied. After 4 days of incubation at a low temperature, *L. incisa* IPPAS C-2047 revealed a notable decrease in the photochemical activity of photosystem II (PSII) and in the efficiency of photosynthetic electron transport as well as a significant increase in the thermal dissipation of the absorbed light energy in the photosynthetic antenna. In contrast, most of the conventional markers of the PSA acclimation to excess light energy, including the total chlorophyll and carotenoid content, violaxanthin cycle pigments content and their deepoxidation, as well as the photosynthetic antennas, PSII and photosystem I (PSI) complexes ratio remained practically unchanged. The content of the major unsaturated fatty acids also remained almost unchanged, except for arachidonic acid (increased by 40%) recently assumed to activate the violaxanthin-deepoxidase by adjusting its lipid microenvironment. Significant changes were observed in the protective protein LhcSR gene expression (4-7-fold increase was observed). Pre-conditioning at 5 °C prior to subsequent acclimation to 0 °C had a positive effect on the PSA photochemical activity. The obtained data show that mid-term (4 days last) acclimation of *L. incisa* IPPAS C-2047 to a positive low temperature at low irradiance leads to PSA response partly typical for high light response. At the same time, the main photoprotective PSA mechanism activated under these conditions is the protein (LhcSR)-dependent quenching of excitation in the photosynthetic antenna.

Keywords: high light stress, low-temperature acclimation, fatty acids desaturation, arachidonic acid, thermal dissipation of light energy, LhcSR, microalgae