

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОИДОВ В ПОБЕГАХ МХА *Hylocomium splendens* Hedw. В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

© 2023 г. А. Г. Ренкова^{а, *}, В. Р. Хабибрахманова^{а, b}, О. П. Гурьянов^а, Е. И. Галеева^а,
А. Б. Мазина^а, Ф. В. Минибаева^а

^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Казанский национальный исследовательский технологический университет”, Казань, Россия

*e-mail: renkova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 15.10.2023 г.

Способность растений адаптироваться к неблагоприятным условиям существования является необходимым условием выживания растений, сохранения генотипа и поддержания разнообразия флоры. Перспективным подходом для решения проблемы повышения устойчивости растений является изучение механизмов стрессовой устойчивости “экстремофилов”, в том числе мхов — высших несосудистых растений. Относительная простота анатомического строения и способность к выживанию в неблагоприятных условиях среды делают эти эволюционно-древние растения идеальными моделями для изучения механизмов адаптации. Известно, что функциональная активность фотосинтетического аппарата способна динамично изменяться при действии стрессовых факторов. В настоящей работе было проведено исследование стресс-индуцированных изменений содержания каротиноидов в лесном мхе гиелокомиум блестящий (*Hylocomium splendens* Hedw.) в условиях температурного стресса. Нами были идентифицированы основные каротиноиды мха *H. splendens*. Установлено, что относительное содержание лютеина, β-каротина и зеаксантина возрастало при действии отрицательной и повышенной температур, тогда как общее содержание каротиноидов при температурном стрессе снижалось. Показано, что 1 ч воздействия неблагоприятных температур приводил к достоверному снижению нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*, причем более сильные изменения наблюдались при воздействии отрицательной температуры. Анализ уровня транскриптов *HsLUT1*, одного из ключевых генов биосинтеза лютеина, при температурном стрессе показал его достоверное увеличение в 4–5 раз. Таким образом, полученные нами данные позволили выявить, что изменения экспрессии гена биосинтеза каротиноидов сопровождаются изменениями их содержания при температурном стрессе. Полученные данные расширяют наше знание о механизмах устойчивости у мохообразных и будут способствовать пониманию эволюционных изменений стрессовой устойчивости высших растений.

Ключевые слова: *Hylocomium splendens*, абиотический стресс, каротиноиды, пигменты, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330323601000, **EDN:** BELXXA

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды — это широко распространенные группы изопреноидных пигментов, образующиеся в результате конденсации восьми изопреноидных единиц. По наличию заместителей их подразделяют на две группы: простые углеводородные соединения — каротины и их окисленные

производные — ксантофиллы, содержащие окси-, эпокси- и кетогруппы. Они синтезируются во всех фотосинтезирующих организмах, а также в некоторых нефотосинтезирующих бактериях и грибах. Согласно немногим данным, папоротники и мхи содержат, в основном, те же самые каротиноиды, что и высшие растения [1].

Биологическая активность каротиноидов определяется их высокой антиоксидантной активностью [2]. Каротиноиды являются активными поглотителями синглетного кислорода в растениях, что обуславливает их важную биологическую функцию — защиту клеточных компонентов, таких как

Сокращения: Био — виолаксантин; ВКЦ — виолаксантиновый цикл; ДФПГ — 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; Зеа — зеаксантин; α-кар — α-каротин; β-кар — β-каротин; Лют — лютеин; Нео — неоксантин; ССК — светособирающие комплексы; ФСІ, ФСІІ — фотосистема I и II; NPQ — нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла.

хлорофиллы, липиды, белки, ДНК и др., от окислительного повреждения. Каротиноиды синтезируются в тесной координации с хлорофиллами, и их состав консервативен у высших растений [3]. В зеленых тканях растений каротиноиды участвуют в механизмах фотозащиты и стабилизации фотосинтетического аппарата [4]. Известно, что ксантофилловый цикл, или виолаксантиновый цикл (ВКЦ), выполняет функцию защиты фотосинтетического аппарата от избытка энергии при повышенной инсоляции и повреждающего действия синглетного кислорода. Цикл включает в себя ферментативные взаимопревращения между виолаксантином (Вио) и зеаксантином (Зеа) (промежуточный продукт — антероксантин) [5, 6]. При этом главную фотопротекторную функцию выполняет Зеа, на который переносится энергия возбуждения хлорофилла и далее преобразуется в тепловую. Этот механизм известен как нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (NPQ) [7]. У каротиноидов выделяют и другие биологические функции, их накопление во многих цветках и плодах обеспечивает привлечение опылителей, способствует рассеиванию семян птицами. Наконец, каротиноиды служат предшественниками для синтеза растительных гормонов — абсцизовой кислоты (АБК) и стриголактонов, а также других апокаротиноидов, которые участвуют во многих процессах развития и стрессовых реакциях [8, 9]. В связи с важностью каротиноидов для физиологии, развития, экологии и эволюции растений, изучение их метаболизма и функций представляет значительный интерес.

Путь биосинтеза каротиноидов широко изучен на высших растениях, и почти все вовлеченные гены выделены и охарактеризованы [10, 11]. У высших растений некоторые гены биосинтеза каротиноидов являются избыточными, что позволяет предположить, что эти гены были дублированы и функционально разошлись в ходе эволюции растений.

В отличие от высших сосудистых растений, в литературе имеется мало информации о составе каротиноидов и их роли в стрессовой устойчивости у мохообразных, которые считаются эволюционно ранними наземными несосудистыми растениями. Для понимания эволюции биосинтеза каротиноидов в растениях изучение данного процесса у мохообразных является весьма актуальной задачей. Анализ литературы выявил наличие лишь единичных работ по исследованию состава каротиноидов и идентификации генов их биосинтеза у мохообразных, в частности, *Physcomitrium patens* и *Marchantia polymorpha* [12, 13]. Как и высшие сосудистые растения, побеги мхов содержат в качестве основных каротиноидов лютеин (Лют) и β -каротин (β -кар) [12]. Ранее нами был проведен анализ антиоксидантной активности органических экстрактов нескольких видов мхов —

Dicranum scoparium, *Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens*, *Sphagnum magellanicum*. Было показано, что среди экстрактивных веществ именно каротиноиды обладают наибольшей антирадикальной активностью в отношении 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). При этом самое высокое количество каротиноидов содержалось в экстракте мха *H. splendens* (неопубликованные данные). Несмотря на широкую распространенность *H. splendens* в лесах Северного полушария и горных местностях, информация о стрессовой устойчивости данного бриофита отсутствует. В частности, остаются практически неизученными изменения каротиноидного состава этого мха в стрессовых условиях. На основании вышесказанного, исследование изменения профиля каротиноидов и генов их биосинтеза малоизученного лесного мха *H. splendens* в условиях температурного стресса является актуальным и может дать недостающую информацию о роли каротиноидов в стрессовых ответах у мохообразных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования был использован мох *Hylocomium splendens* Hedw., собранный в лесах Айшинского лесничества Республики Татарстан (55°53' 21.3 с.ш 48°38' 14.3 в.д) в мае 2022 г. После предварительной очистки сухие побеги мха хранились в контролируемых прохладных условиях в темноте. Основываясь на полученных ранее результатах по оценке фотосинтетической активности разных ярусов мха *H. splendens* на воздействие неблагоприятных температур [14], для анализа нами была использована верхняя часть побега (первые два яруса), в которой метаболические процессы идут интенсивнее, в т. ч. ответные реакции на стрессовые воздействия.

Стрессовая обработка. Побеги мха *H. splendens* гидратировали дистиллированной водой в течение 24 ч при температуре 10°C в условиях темноты. Далее гидратированные образцы мха инкубировали в течение 1 ч в климатической камере с контролируемой отрицательной (–20°C) и повышенной (30°C) температурами. Для оценки стрессового ответа мха материал отбирали сразу же после воздействия неблагоприятных температур, а также через 1, 3, 5, 24 ч выдерживания мха при комнатной температуре после стрессового воздействия. Оводненность образцов мха определяли в каждой временной точке высушиванием до постоянного веса на анализаторе влажности АВГ-60 (“Госметр”, Россия).

Анализ профиля каротиноидов. Исследование состава и содержания каротиноидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LicArt 62 (“Лабконцепт”, Россия). Пробоподготовку и раз-

деление пигментов осуществляли согласно [15] с небольшими модификациями. Образец мха растирали в жидком азоте, из полученного порошка отбирали навеску массой 0.1 г и переносили в эпепендорф, добавляли 0.5 мл ацетона. Для интенсификации извлечения каротиноидов смесь в эпепендорфе подвергали обработке 5 мин ультразвуком (ванна ультразвуковая “Сапфир”, Россия), далее центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. Стадии экстрагирования повторяли до максимально полного извлечения пигментов из навески мха (5–6 стадий). Полученные экстракты объединяли и высушивали на ротационном испарителе RV 8 (“IKA”, Германия). Для ВЭЖХ использовали: элюент А – ацетонитрил : метанол : вода (75 : 12 : 4), элюент В – метанол : этилацетат (68 : 32). Высушенные экстракты пигментов растворяли в 400 мкл элюента А, центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин, 20 мкл супернатанта отбирали и хроматографировали на колонке с обращенной фазой Inertsil ODS-3, 3 мкм, 4.6 × 100 мм (“GL Sciences”, Япония). Соединения хроматографировали при градиентном режиме со следующей последовательностью элюентов: 0 мин А – 100%; 0–15 мин А – 0% и В – 100%; 15–40 мин В – 100%. Скорость потока элюента 0.5 мл/мин. Температура хроматографирования составляла 25°C. Каротиноиды детектировали с помощью диодно-матричного детектора DAD-62 (“Лабкон-цепт”, Россия) при 440 нм. Управление работой хроматографа, прием и обработку полученных данных проводили с помощью специализированной компьютерной программы “LicArt WSV”.

Идентификацию каротиноидов в экстрактах мха осуществляли по электронным спектрам в области 300–700 нм [16, 17] и путем сопоставления с временами выхода стандартов каротиноидов – β-каротина и лютеина (“Sigma-Aldrich”, США, степень чистоты не менее 95%), хроматографируемых при аналогичных условиях.

Анализ относительного уровня экспрессии генов. Анализ экспрессии гена каротин ε-монооксигеназы (*HsLUT1*) осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК *H. splendens* выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия), согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”, США), целостность проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) проводили на термоциклере C1000 Touch™ (“Bio-Rad”, США) с набором MMLV RT (“Евроген”, Россия) в реакционном объеме 25 мкл по стандартному протоколу производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием системы CFX Connect Real-Time PCR (“Bio-Rad”, США). Оценку уровня экспрессии гена *HsLUT1* осуществляли относительно референсных генов:

18S рРНК (*18S*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH2*), α-тубулина 1 (*TUB1*), α-тубулина 2 (*TUB2*) [18].

Анализ фотосинтетических параметров. Модулированную флуоресценцию хлорофилла *a* измеряли на базе системы РАМ (от англ. Pulse Amplitude Modulation) при помощи флуориметра FMS1+ (“Hansatech Instruments”, Великобритания) со стандартной листовой клипсой с использованием красного светодиода. После периода темновой адаптации продолжительностью не менее 10 мин производили вспышку насыщающего света в 85 ед. продолжительностью 0.7 с (максимальная интенсивность до 13000 мкмоль фотонов/м² с) и измеряли максимальную флуоресценцию (F_M). После снижения уровня флуоресценции до исходного темнового значения (F_0) включали непрерывный действующий свет с плотностью потока 105 мкмоль фотонов/м² с, и через 40 с включали второй насыщающий импульс для определения максимального выхода флуоресценции (F'_M) в адаптированном к свету состоянии. По полученным значениям рассчитывали NPQ по формуле:

$$NPQ = (F_M - F'_M) / F'_M.$$

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3–6 биологических повторностях и 3–14 аналитических повторностях. Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений со стандартными ошибками (SE). Все экспериментальные данные имеют нормальное распределение признака. Для сравнения их средних арифметических значений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с оценкой попарных различий с помощью критериев Тьюки, Бонферрони. Различия в экспрессии генов оценивали по нормализованной экспрессии ($\Delta\Delta C_q$) в Bio-Rad CFX Maestro, достоверность анализировали с использованием ANOVA и по тесту на нормальность по Шапиро–Уилку.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав и динамика изменений содержания каротиноидов в побегах мха в условиях температурного стресса

В настоящей работе проведено исчерпывающее экстрагирование и анализ состава и содержания каротиноидов из побегов мха *H. splendens*. Установлено, что в составе каротиноидов преобладают ксантофиллы (80–85%), среди которых основную долю занимает Лют (в среднем 46–50%) (табл. 1). Стоит отметить, что из ксантофиллов, входящих в ВКЦ, преобладает Вио, содержание которого почти в 4 раза выше содержания Зеа. Антероксантин, являющийся промежуточным продуктом взаимопревращений Вио и Зеа в

Таблица 1. Состав и динамика изменения относительного содержания каротиноидов в побегах мха *H. splendens* в условиях температурного стресса.

Каротиноиды	Относительное содержание, % (расчет по площади пиков)					
	контроль	стрессовое воздействие	постстрессовый период после стрессового воздействия			
			1 ч	3 ч	5 ч	24 ч
–20°C						
н.и. 1	3.17 ± 0.01	2.46 ± 0.04***	3.55 ± 0.16	1.69 ± 0.10***	1.99 ± 0.22**	1.74 ± 0.04***
Нео	5.33 ± 0.01	6.30 ± 0.11***	5.38 ± 0.23	4.74 ± 0.08**	4.67 ± 0.09**	5.14 ± 0.12
Вио	12.4 ± 0.01	3.34 ± 0.06***	5.94 ± 0.16***	5.08 ± 0.37***	4.81 ± 0.11***	2.97 ± 0.20***
Лют	50.5 ± 0.02	52.5 ± 0.78	53.6 ± 0.07***	51.8 ± 0.13***	51.9 ± 0.45*	54.5 ± 0.08***
Зеа	2.78 ± 0.08	5.25 ± 0.09***	5.51 ± 0.13***	4.76 ± 0.11***	4.91 ± 0.1***	5.16 ± 0.39**
н.и. 2	2.85 ± 0.04	4.09 ± 0.03***	4.53 ± 0.01***	4.15 ± 0.01***	4.14 ± 0.02***	4.33 ± 0.17***
н.и. 3	3.25 ± 0.02	3.94 ± 0.07***	4.03 ± 0.02***	4.16 ± 0.00***	4.08 ± 0.01***	4.20 ± 0.02***
α-кар	1.16 ± 0.01	1.27 ± 0.02**	1.58 ± 0.02***	1.10 ± 0.04	1.00 ± 0.03**	0.94 ± 0.01***
β-кар	18.3 ± 0.02	20.6 ± 0.37**	15.9 ± 0.40**	22.5 ± 0.46***	22.9 ± 0.06***	20.9 ± 0.20***
Общее содержание	100	76.0 ± 0.1***	78.9 ± 0.7***	51.2 ± 0.5***	42.2 ± 2.5***	44.9 ± 1.1***
30°C						
н.и. 1	6.96 ± 0.02	3.73 ± 0.07***	4.48 ± 0.11***	3.47 ± 0.31***	3.21 ± 0.08***	4.86 ± 0.07***
Нео	6.03 ± 0.36	5.22 ± 0.18	5.23 ± 0.01	5.16 ± 0.34	5.04 ± 0.04*	5.08 ± 0.09*
Вио	11.7 ± 0.09	6.16 ± 0.25***	6.34 ± 0.51***	5.67 ± 0.78***	5.40 ± 0.10***	4.45 ± 0.66***
Лют	46.4 ± 0.10	52.2 ± 0.85**	50.9 ± 1.21*	50.5 ± 0.82**	51.1 ± 0.43***	51.3 ± 0.98**
Зеа	3.93 ± 0.36	5.94 ± 0.27	5.38 ± 0.03	5.61 ± 0.07	5.63 ± 0.20	7.24 ± 0.05*
н.и. 2	3.72 ± 0.09	4.27 ± 0.04**	4.27 ± 0.06**	4.25 ± 0.01**	4.24 ± 0.05**	4.33 ± 0.01**
н.и. 3	3.27 ± 0.02	3.60 ± 0.03***	3.58 ± 0.05**	3.70 ± 0.08**	3.89 ± 0.01***	3.32 ± 0.18
α-кар	1.38 ± 0.04	1.11 ± 0.04**	1.30 ± 0.01	1.29 ± 0.04	1.23 ± 0.09	1.30 ± 0.10
β-кар	14.6 ± 0.57	17.8 ± 0.35**	18.5 ± 0.92*	20.3 ± 0.04***	20.2 ± 0.05***	17.9 ± 0.27**
Общее содержание	100	58.3 ± 1.1***	59.2 ± 1.2***	32.5 ± 1.2***	46.2 ± 0.1***	36.8 ± 1.7***

Примечание. Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; α-кар – α-каротин; β-кар – β-каротин; н. и. – не идентифицированный каротиноид. В таблице представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 3$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA при $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***).

ВКЦ, не детектировался с помощью ВЭЖХ, что, вероятно, свидетельствует об очень низком содержании этого ксантофилла в общем пуле каротиноидов мха *H. splendens*. Среди каротинов наибольшую долю занимает β-кар (15–18%). Три каротиноида, обнаруженных в экстракте мха, идентифицировать не удалось. При этом два из них (н.и. 2 и н.и. 3) по времени выхода и максимумам поглощения на электронных спектрах [16, 17] могут быть отнесены к α-криптоксантину и β-криптоксантину, соответственно. Содержание этих каротинов в побегах мха сопоставимо (табл. 1).

При воздействии неблагоприятных температур состав каротиноидов мха *H. splendens* сохранялся, однако их суммарное количество снижалось в среднем на 25–40% (табл. 1). Среди каротиноидов достоверно снижалась доля Вио, в среднем в 4 и 2 раза при воздействии отрицательной (–20°C) и повышенной (30°C) температуры, соответственно.

В условиях температурного стресса увеличивалось содержание Зеа и β-кар примерно на 2% и 3%, соответственно. Содержание Лют достоверно увеличивалось только при воздействии повышенной (30°C) температуры.

Установлено, что через 1 ч после выдерживания при комнатной температуре в побегах мха, подвергнутых воздействию отрицательной (–20°C) температуры, наблюдается падение доли β-кар в 1.3 раза, но увеличивается в 1.8 раза содержание Вио. В последующий постстрессовый период в течение 24 ч общее содержание каротиноидов в побегах мха *H. splendens* падало почти в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 1). При этом уже через 3 ч восстановления побегов мха после температурного стресса содержание β-кар возрастало примерно на 6.5% по сравнению с побегами, подвергнутыми холодовой обработке, и на 4% по сравнению с контролем. Содержание Лют в побе-

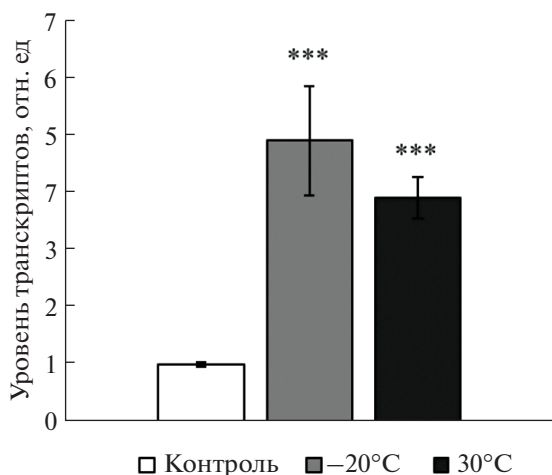


Рис. 1. Уровень транскриптов гена *HsLUT1* в *H. splendens* при действии низкой отрицательной и положительной температур. Уровень транскриптов контрольных вариантов принят за единицу. Три звездочки представляют значительную разницу при $P \leq 0.001$.

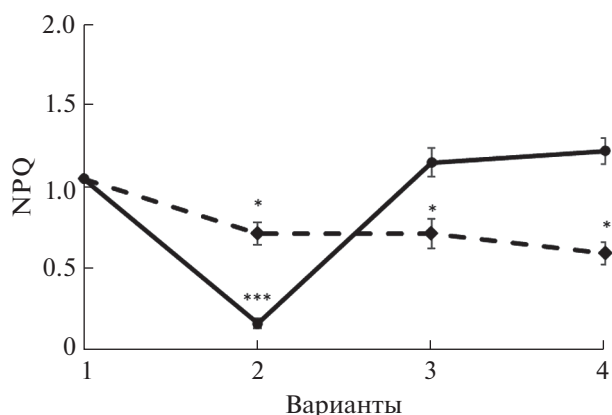


Рис. 2. Нефотохимическое тушение (NPQ) в побегах мха *H. splendens* при действии неблагоприятных температур: -20°C (сплошная линия) и 30°C (штриховая линия). 1 — контроль; 2 — стрессовое воздействие; 3 — 1 ч постстрессового периода после стрессового воздействия; 4 — 24 ч постстрессового периода после стрессового воздействия. На рисунке представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки (SE) при $n = 14$. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при $P < 0.05$ (*); $P < 0.001$ (***)

гах мха достоверно увеличивалось только к 24 ч в последующий постстрессовый период после воздействия отрицательной температуры: на 2% по сравнению с побегами, подвергнутыми холодной обработке, и на 4% по сравнению с контролем. Содержание Вио в побегах мха постепенно снижалось, и через 24 ч после стрессового воздействия его количество падало до уровня, обнару-

живаемого в побегах сразу же после стрессовой обработки (табл. 1).

Обработка побегов мха *H. splendens* повышенной температурой, так же, как и при воздействии отрицательной температуры, приводила к заметному снижению содержания каротиноидов, их количество уменьшалось почти в 3 раза по сравнению с контролем (табл. 1). При этом заметных изменений в содержании основных каротиноидов — Лют и β -кар не наблюдалось. Достоверно увеличивалось содержание Зеа, через 24 ч в последующий постстрессовый период его количество было выше на 1.3% по сравнению с побегами, подвергнутыми обработке, и на 3.3% по сравнению с контролем. Снижение содержания Вио, обусловленное температурным стрессом, наблюдалось и в постстрессовый период. Через 24 ч выдерживания мха при оптимальной температуре его количество было на 1.7% меньше, по сравнению с его уровнем в побегах мха сразу же после воздействия повышенной температуры (табл. 1).

Экспрессия гена биосинтеза лютеина HsLUT1 в побегах мха H. splendens в условиях температурного стресса

Ранее нами были клонированы и секвенированы десять генов биосинтеза каротиноидов мха *H. splendens* [18]. В настоящей работе мы проанализировали изменение относительного уровня транскриптов основного гена биосинтеза лютеина *HsLUT1* при действии низкой отрицательной (-20°C) и положительной (30°C) температур (рис. 1). Так, достоверное 5-кратное увеличение относительного уровня транскриптов *HsLUT1* наблюдалось при действии -20°C в течение 1 ч. При действии 30°C также происходило достоверное повышение относительного уровня транскриптов *HsLUT1*, но в меньшей степени, в 4 раза.

Изменения фотосинтетических параметров в побегах мха H. splendens в условиях температурного стресса

Было показано, что 1 ч воздействие неблагоприятных температур приводило к достоверному снижению NPQ, причем более сильные изменения наблюдались при воздействии отрицательной температуры (рис. 2). Разнонаправленные изменения NPQ наблюдались в постстрессовый период. Так, через 1 ч выдерживания мха при оптимальной температуре после воздействия отрицательной температуры уровень NPQ повышался в 8 раз, восстанавливаясь до контрольного уровня, а при воздействии повышенной температуры он практически не изменялся. В последующем через 24 ч постстрессового периода после воздействия обеих неблагоприятных температур значения NPQ существенно не изменялись (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В течение своего жизненного цикла растения испытывают воздействие различных видов стрессовых воздействий, таких как засуха, засоление и высокая температура. Знание о механизмах чувствительности и/или устойчивости видов растений к изменяющимся условиям внешней среды является необходимым условием для обеспечения выживания растений, сохранения их генотипа и поддержания разнообразия флоры. Растения выработали различные механизмы устойчивости к стрессу, включая регуляцию фотосинтеза; детоксикацию активных форм кислорода (АФК) за счет усиления активации антиоксидантных ферментов и накопления низкомолекулярных антиоксидантов; а также накопления вторичных метаболитов, в частности, каротиноидов [19]. Согласно современным представлениям, основными биологическими функциями каротиноидов являются светособирающая, антиоксидантная, фотопротекторная и структурная функции [19, 20]. Многочисленными исследованиями доказано, что уровень каротиноидов в растениях может быть связан со стрессовой устойчивостью. Например, устойчивость к солевому стрессу у бобов тесно коррелирует с устойчивым уровнем каротиноидов, а сахарный тростник повышает свою солеустойчивость за счет снижения содержания хлорофилла и стабильного уровня каротиноидов [19]. При произрастании живучки ползучей в открытых местообитаниях, и соответственно, в условиях высокой инсоляции, адаптивными реакциями в растениях являлись уменьшение содержания хлорофиллов в листьях и светособирающих комплексов (ССК) фотосистем, активирование конверсии пигментов в ВКЦ с накоплением Зеа (деэпоксидации подвергалось до 80% пула Вио) [6]. В работе Arroniz-Crespo с соавт. идентифицирован состав каротиноидов мха *H. splendens* и показаны изменения в их содержании при воздействии УФ-Б облучения [21]. К сожалению, в литературе имеется крайне ограниченная информация об изменениях пула каротиноидов в растениях при действии неблагоприятных температур. В связи с этим основной целью настоящей работы была оценка изменений профиля каротиноидов в побегах мха *H. splendens* при действии неблагоприятных температур. Состав каротиноидов мха *H. splendens* соответствует имеющимся литературным данным [21], за исключением Ант, не детектируемым в экстрактах мха. Можно полагать, что содержание этого ксантофилла во мхе очень мало. Основными каротиноидами являются Лют и β -кар. Дополнительно в составе каротиноидов мха показано наличие α -кар, на долю которого приходится в среднем 1%. Три каротиноида, обнаруженные в экстракте мха, точно идентифицировать не удалось, однако, основываясь на литературных данных [16, 17], каротиноиды (н.и. 2 и н.и. 3) могут

быть отнесены к α -криптоксантину и β -криптоксантину, соответственно. Показано, что воздействие обеих неблагоприятных температур вызывает существенное снижение общего содержания каротиноидов. При этом анализ индивидуальных каротиноидов позволил установить, что именно содержание Вио резко падает при стрессовой обработке, и даже через 24 ч выдерживания мха при оптимальной температуре после воздействия его уровень не восстанавливается до контрольного уровня, а, напротив, становится еще меньше (табл. 1). Общим изменением в профиле каротиноидов мха *H. splendens* при действии обеих неблагоприятных температур является увеличение содержания Лют, Зеа и β -кар, наблюдаемое непосредственно после стрессовой обработки и в постстрессовом периоде (через 24 ч). На рис. 3 представлена схема пути биосинтеза каротиноидов у растений. Типичные каротиноиды (тетра-терпены) синтезируются из первого каротиноидного фитоена, который образуется в результате конденсации двух молекул геранилгеранилдифосфата. Как видно из схемы биосинтеза каротиноидов, Лют образуется из α -кар. Содержание этого ксантофилла наибольшее в фотосинтетическом аппарате высших растений. Он выполняет такие важные функции, как стабилизация структуры антенных белков, светособирающая и фотопротекторная функции [6, 7]. Увеличение содержания Лют в побегах мха при действии неблагоприятных температур (табл. 1) коррелирует с данными [23], где показано, что при низких положительных температурах в связи с ростом вероятности образования АФК в ССК фотосинтетического аппарата наблюдается накопление Лют, выполняющего в этом случае функцию антиоксиданта. В связи с тем, что Лют является преобладающим каротиноидом мха *H. splendens*, представлялось целесообразным проанализировать изменения экспрессии гена его биосинтеза в ответ на действие неблагоприятных температур. Основным ферментом биосинтеза лютеина является каротин ϵ -монооксигеназа – CYP97C1 или LUT1 [24]. Это фермент, катализирующий стереоспецифическую реакцию, является представителем семейства 97 цитохрома P450 – наиболее древних растительных P450. Ранее сообщалось, что в стареющих листьях *A. thaliana* экспрессия *AtCYP97C1* значительно снижалась, что сопровождалось снижением содержания каротиноидов α -каротиновой ветви пути биосинтеза [25]. В наших экспериментах показано, что экспрессия *HsLUT1* при действии отрицательной и положительной температур увеличивается в 5 и 4 раза, соответственно (рис. 1), что согласуется с данными по стресс-индуцированному увеличению содержания каротиноидов α -каротиновой ветви пути биосинтеза (α -кар и Лют) (табл. 1). Таким образом, можно полагать, что *HsLUT1* вовлечен в реакции мха

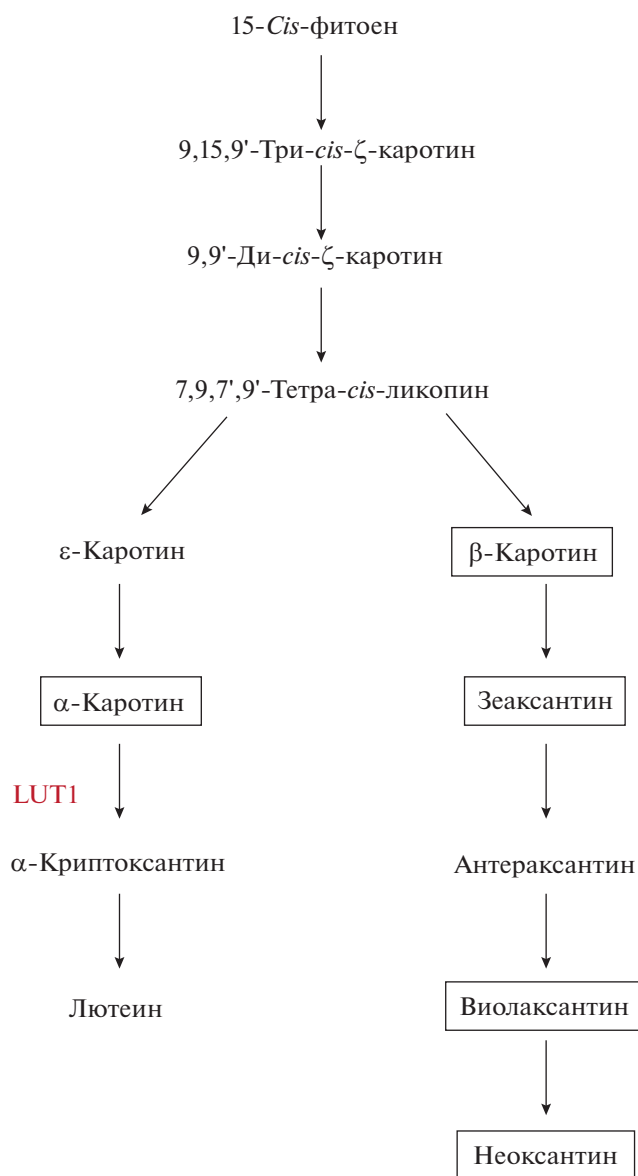


Рис. 3. Схема пути биосинтеза каротиноидов у растений. Прямоугольником показаны метаболиты, которые количественно были определены в данном исследовании. Показан фермент LUT1 – каротин ϵ -монооксигеназа, анализ гена которого проводился в данном исследовании.

H. splendens на температурный стресс. При гидроксигировании β -кар образуется Зеа, ключевой участник ВКЦ. Поскольку в общей сумме каротиноидов мха увеличивается содержание β -кар и Зеа, можно предположить, что в условиях температурного стресса активируется биосинтез непосредственно β -кар, тогда как прирост Зеа, по-видимому, обусловлен степенью дезоксидации Вио. Действительно, его содержание резко падает, как при действии отрицательной, так и повышенной температур (табл.1). Повышение уровня β -кар в побегах мха, обладающего высокими ан-

тиоксидантными свойствами, может обеспечивать защиту мембран, ДНК и других клеточных структур от окислительного повреждения, вызванного воздействием неблагоприятных температур. Кроме того, β -кар, входящий в структуру реакционных центров фотосистемы I и II (ФС I и ФС II), может способствовать сохранению этих комплексов [20]. Не менее важным является повышение уровня Зеа в побегах мха (табл. 1). Известно, что он играет роль антиоксиданта и стабилизатора структуры мембран, участвуя в детоксикации АФК и подавляя перекисное окисление липидов [7]. Надо отметить, что Зеа играет ключевую роль в защите ФС II от фотоингибирования вследствие увеличения теплового рассеивания той части энергии, которая не используется для фотосинтетического электронного транспорта. Обычно увеличение пула Зеа при стрессовых воздействиях находится в прямой зависимости с показателем NPQ [7]. В наших экспериментах, несмотря на увеличение содержания Зеа, показатель NPQ существенно падает, причем более выражено при воздействии отрицательной температуры. Далее, в постстрессовый период после воздействия отрицательной температуры, он восстанавливается до контрольного уровня, а после воздействия повышенной температуры уровень NPQ не изменяется (рис. 2). Объяснить наблюдаемый эффект сложно, можно только предположить, что повышение уровня каротиноидов в условиях температурного стресса, главным образом, обусловлено необходимостью “тушить” синглетный кислород. Известно, что Зеа играет важную роль в стрессовой устойчивости растений к холоду. Например, в работе Tang с соавт. было показано, что предварительная обработка Зеа повышает устойчивость проростков перца к холоду, снижает повреждение листьев от охлаждения, увеличивает биомассу растений и содержание фотосинтетических пигментов в условиях холодного стресса. Было также установлено, что экзогенный Зеа повышает устойчивость к холоду, индуцируя накопление эндогенного Зеа [26]. Таким образом, было выявлено, что изменения экспрессии гена *HsLUT1* при температурном стрессе сопровождаются изменениями содержания каротиноидов. Полученные приоритетные данные расширяют наше знание о механизмах устойчивости у мохообразных и будут способствовать пониманию эволюционных изменений стрессовой устойчивости высших растений. Авторы А.Г. Ренкова и В. Р. Хабибрахманова внесли одинаковый вклад в данную работу. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-24-00595). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sabovljevic M., Bijelovic A., Grubisic D. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds // *Med Raw*. 2001. V. 21. P. 17.
2. Krinsky N.I. Antioxidant function of carotenoids // *Free Radical Biol. Med*. 1989. V. 7. P. 617. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90143-3)
3. Meier S., Tzfadia O., Vallabhaneni R., Gehring C., Wurtzel E.T. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Syst. Biol*. 2011. V. 5. P. 77. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-77>
4. Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J. "Carotenoids and photosynthesis," in *Carotenoids in Nature*. Springer: Cham, Switzerland, 2016. P. 111.
5. Falkowski P.G., Raven J.A. *Aquatic photosynthesis*. Malden. USA: Blackwell Sci., 1997. 375 p.
6. Дымова О.В., Захожий И.Г., Головки Т.К. Возрастные и адаптивные изменения фотосинтетического аппарата листьев зимне-зеленого травянистого растения *Ajuga reptans* L. в природных условиях таежной зоны // *Физиология растений*. 2023. Т. 70. С. 577.
7. Demming-Adams B., Garab G., William Adams III, Govindjee. *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria*. Springer Dordrec, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9032-1>
8. Hou X., Rivers J., León P., McQuinn R.P., Pogson B.J. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants // *Trends Plant Sci*. 2016. V. 21. P. 792. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
9. Jia K., Baz L., Al-Babili S. From carotenoids to strigolactones // *J. Exp. Bot*. 2017. V. 69. P. 2189. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx476>
10. Chaundhary N., Nijhawan A., Khurana J.P., Khurana P. Carotenoid biosynthesis genes in rice: structural analysis, genomewide expression profiling and phylogenetic analysis // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. V. 283. P. 13.
11. Ruiz-Sola M.A., Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10: e0158. 2012. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>
12. Takemura M., Maoka T., Misawa N. Carotenoid analysis of a liverwort *Marchantia polymorpha* and functional identification of its lycopene b- and e-cyclase genes // *Plant Cell Physiol*. 2014. V. 55. P. 194. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct170>
13. He J., Li P., Huo H., Liu L., Tang T., He M., Huang J., Liu L. Heterologous expression of HpBHY and CrBKT increases heat tolerance in *Physcomitrella patens* // *Plant Diversity*. 2019. V. 41. P. 266. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.04.001>
14. Часов А.В., Минибаева Ф.В. Фотосинтетический аппарат мха гилокомиума блестящего устойчив к низким экстремальным температурам // *Экология*. 2023. №6. (в печати).
15. Дымова О.В., Кузванова О.А. Оптимизация способа экстракции фотосинтетических пигментов и их содержание в талломах лишайников // *Химия растительного сырья*. 2018. № 2. С. 137. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018023013>
16. Jiao Y., Reuss L., Wang Y. β -Cryptoxanthin: chemistry, occurrence, and potential health benefits // *Curr. Pharmacol*. 2019. V. 5. P. 20. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00168-7>
17. Gama J.J.T., Sylos C.M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC // *Food Res. Intern*. 2005. V. 38. P. 899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.008>
18. Renkova A.G., Koulintchenko M.V., Mazina A.B., Leksin I.Y., Minibayeva F.V. Identification, characterization, and expression analysis of carotenoid biosynthesis genes in the moss *Hylocomium splendens* // *Theor. Exp. Plant Physiol*. 2023. (в печати).
19. Wahid A., Ghazanfar A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane // *J. Plant Physiol*. 2006. V. 163. P. 723. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.07.007>
20. Swapnil P., Meena M., Singh S.K., Dhuldhaj U., Harish Marwal A. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects // *Curr. Plant Biol*. 2021. V. 26. P. 100203. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100203>
21. Arróniz-Crespo M., Gwynn-Jones D., Callaghan T.V., Núñez-Olivera E., Martínez-Abaigar J., Horton P., Phoenix G. K. Impacts of long-term enhanced UV-B radiation on bryophytes in two sub-Arctic heathland sites of contrasting water availability // *Ann. Bot*. 2011. V. 108. P. 557. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr178>
22. Huang J., Zhong Y., Liu J., Sandmann G., Chen F. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin // *Metab. Eng*. 2013. V. 17. P. 59. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.02.005>
23. Popova A.V., Dobrev K., Velitchkova M., Ivanov A.G. Differential temperature effects on dissipation of excess light energy and energy portioning in lut2 mutant of *Arabidopsis thaliana* under photoinhibitory conditions // *Photosyn. Res*. 2019. V. 139. P. 367. <https://doi.org/10.1007/s11220-018-0511-2>
24. Tian L., Della Penna D. Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants LUT1 // *Arch Biochem. Biophys*. 2004. V. 430. P. 22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.003>
25. Breeze E., Harrison E., Mchattie S., Hughe, L., Hickman R., Hill C. High-breeze resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 873. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083345>
26. Tang C., Xie J., Ly J., Li J., Zhang J., Wang C., Liang G. Alleviating damage of photosystem and oxidative stress from chilling stress with exogenous zeaxanthin in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings // *Plant Physiol. Biochem*. 2021. V. 163. P. 395. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.010>