

Г. О. Прядкіна, Т. М. Шадчина

**Онтогенетичні зміни вмісту ксантофільних пігментів у листках ярої пшениці залежно від рівня азотного живлення***(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)*

*The dynamics of the content of various xanthophyll pigments in leaves of spring wheat during vegetation at two contrast levels of nitrogen supply was investigated. At a high level of nitrogen nutrition, the contents of violaxanthin, lutein, neoxanthin, antheraxanthin, and zeaxanthin per 1 dm<sup>2</sup> of the leaf surface increased from tillering to milk grain ripening. At a low level of nitrogen nutrition, the increase was less intensive, and the period of its rising was shorter (limitation by the phase of earling). The contents of violaxanthin, lutein, and neoxanthin per 1 mg chlorophyll were risen during vegetation and did not depend on the level of nitrogen supply. But the relative content of zeaxanthin was higher at nitrogen deficit nutrition. The results testify to the close interrelation between the contents of xanthophylls and chlorophylls and to the increase of the defensive role of zeaxanthin under stress conditions induced by nitrogen deficit.*

На відміну від хлорофілів, які є пігментами, що відіграють основну роль у процесах збирання та запасання сонячної енергії в процесі фотосинтезу, ксантофілам відводять допоміжну роль. Проте вони виконують багато важливих функцій у хлоропластах рослин: при низькій інтенсивності освітлення додатково абсорбують світло в синьо-зеленій області спектра, при високій, навпаки — захищають мембрани тилакоїдів від фоторуйнування, а також беруть участь у регуляції в'язкості цих мембран та їх термотолерантності [1–3]. Особливістю жовтих пігментів також є здатність деяких з них замінювати інші. Так, зеаксантин може структурно і функціонально замінювати відсутні в деяких мутантах вищих рослин та зелених водоростей лютеїн, віолаксантин та неоксантин [4, 5], лютеїн-5,6-епоксид — неоксантин [6], а бета-каротин — лютеїн [7].

На відміну від бактерій, грибів, водоростей та репродуктивних органів рослин, що характеризуються великою різноманітністю жовтих пігментів, хлоропласти листків вищих рослин та зелених водоростей містять однаковий набір ксантофілів, який складається з лютеїну, неоксантину, віолаксантину, зеаксантину та антраксантину [8]. За умов варіації освітленості три останні змінюються таким чином, що віолаксантин на світлі перетворюється у зеаксантин, а в темряві зеаксантин знову перетворюється у віолаксантин. Причому в кожному з цих перетворень проміжною формою виступає антраксантин [1].

Результати досліджень особливостей функціонування віолаксантинового циклу за різних умов вирощування рослин, у тому числі і дефіциту азотного живлення, свідчать про більш інтенсивне перетворення віолаксантину в зеаксантин за дії стресових чинників [9–11]. Є також дані про зміни вмісту ксантофілів у листках рослин впродовж вегетації. У більшості з робіт відмічено зростання кількості ксантофілів у процесі вегетації [12–14]. Так, вміст лютеїну та неоксантину в листках двох сортів рису на 100-ту добу вегетації був в 1,1–1,3 раза вищим, ніж на 60-ту [12]. Кількість вільних ксантофілів у листках яблуні в серпні в 1,5–2 раза перевищувала її значення в квітні [13]. Але також показано, що в онтогенезі листків

одного з видів (*mexicana*) реліктової рослини саговнику, на відміну від інших її видів, вміст окремих ксантофілів змінювався по-різному: кількість лютеїну та віолаксантину в дорослих листках була в 1,2–1,4 раза більшою, ніж у молодих листках, тоді як вміст зеаксантину, навпаки, знижувався в 2,5 раза, а неоксантину та антраксантину — не змінювався [14]. Але дані про вплив умов вирощування на характер динаміки змін вмісту різних ксантофілів впродовж вегетації практично відсутні. Разом з тим такі дані дозволили б краще зрозуміти роль ксантофільних пігментів у забезпеченні стійкості рослин до стресів на різних етапах онтогенезу за різних умов вирощування.

Ми ставили собі за мету дослідити вплив забезпеченості рослин азотним живленням на динаміку змін вмісту різних ксантофільних пігментів, у тому числі і пігментів віолаксантинного циклу, у листках ярої пшениці впродовж вегетації.

Рослини ярої пшениці сорту Рання 93 вирощували у 8-кг вегетаційних посудинах на сірому опідзоленому ґрунті, що містив 0,15% азоту та 17,9 мг рухомого фосфору і 16,9 мг обмінного калію на 100 г абсолютно сухого ґрунту. При посіві в посудини контрольного варіанта вносили повну поживну суміш (за Журбицьким), що містила по 0,125 г діючої речовини азоту, фосфору та калію на 1 кг ґрунту. Дослідним був варіант, в якому в поживну суміш не включали азот, чим створювали умови недостатності азотного живлення. Нестачу азотного живлення фіксували за зниженням, порівняно з контролем, вмісту хлорофілу в листках. Ксантофільні пігменти визначали в листках пшениці в різні фази її вегетації (кущіння, виходу в трубку, колосіння, цвітіння, молочно-воскової стиглості).

Біологічна повторність дослідів — 5-разова, аналітична — 3-разова.

Оскільки вміст ксантофілів віолаксантинного циклу змінюється залежно від умов освітлення, причому в протилежних напрямках, їх кількість завжди визначали у темноадаптованих листках. Для цього вранці рослини попередньо затемнювали на 3 год чорною тканиною. Відібрані листові висічки заморожували в рідкому азоті та зберігали до проведення аналізів у морозильній камері при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Для екстрагування пігментів рослинні проби розтирали в 100% ацетоні з додаванням невеликої кількості рідкого азоту та бутилгідроксианізола і центрифугували 20 хв при 8 000 g. Отримані елюати ксантофілів розділяли на рідинному хроматографі високого тиску сумішшю ацетонітрилу, метанолу та дистильованої води у співвідношенні 70 : 9,6 : 3 відповідно [15].

Як показали отримані результати, вміст хлорофілу в листках варіанта з вилученим з поживної суміші азотом (дослідний варіант) у фазу виходу в трубку був нижчим ніж, у контрольного, в 1,3 раза ( $(3,6 \pm 0,2)$  та  $(4,8 \pm 0,2)$  мг/дм<sup>2</sup> відповідно), а у фазу молочної стиглості — в 4 рази ( $(2,2 \pm 0,3)$  та  $(9,0 \pm 0,9)$  мг/дм<sup>2</sup> відповідно), що свідчило про розвиток азотного дефіциту у рослин дослідного варіанта.

Зміни вмісту ксантофілів, виміряних в мкг на одиницю листової поверхні (дм<sup>2</sup>) верхнього повністю розгорнутого (у період від фази кущіння до фази колосіння) або прапорцевого листка (після цієї фази) ярої пшениці сорту Рання 93, за контрастних умов азотного живлення наведені на рис. 1. Можна бачити, що в процесі розвитку рослин за нормальних умов забезпечення рослин азотним живленням динаміка вмісту кожного з ксантофілів характеризувалася поступовим зростанням кількості пігменту. При цьому впродовж усього вегетаційного періоду найбільш високим був вміст лютеїну. Його кількість у листках зростала від  $(458 \pm 49)$  мкг/дм<sup>2</sup> у фазу кущіння до  $(1353 \pm 118)$  мкг/дм<sup>2</sup> у фазу молочної стиглості (див. рис. 1, а). Істотно зростав також вміст віолаксантину та неоксантину — від  $(190 \pm 17)$  та  $(150 \pm 5)$  мкг/дм<sup>2</sup> відповідно у фазу кущіння до  $(468 \pm 71)$  та  $(336 \pm 48)$  мкг/дм<sup>2</sup> у фазу молочно-воскової стиглості (див. рис. 1, б, в). Найменші величини отримані для вмісту зе-

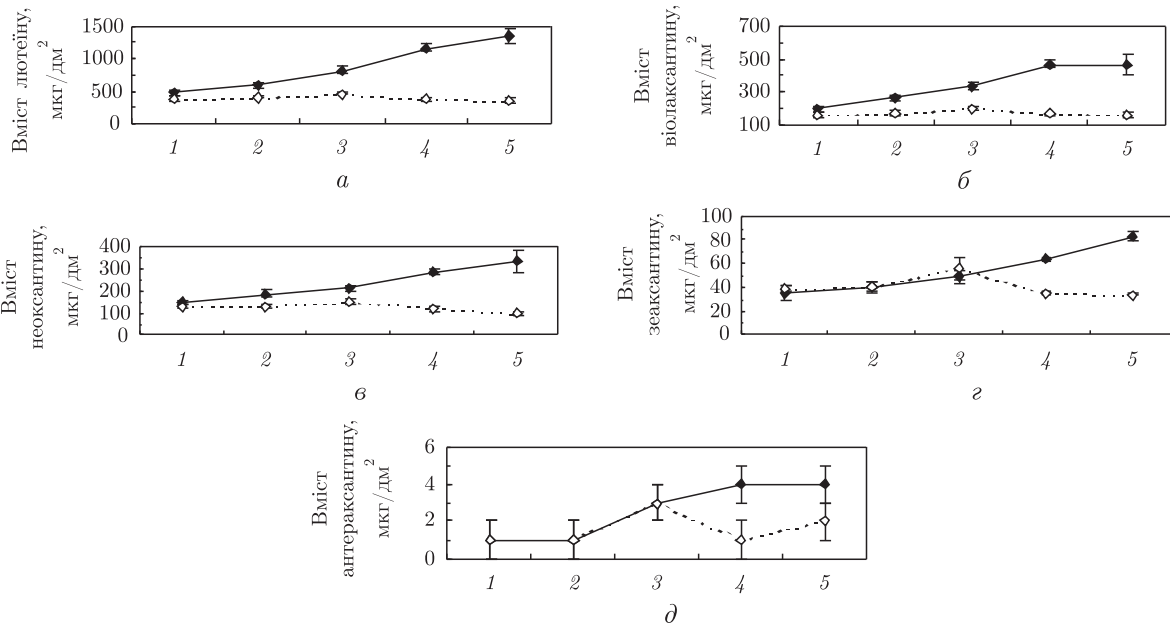


Рис. 1. Динаміка змін вмісту окремих ксантофілів у процесі вегетації за наявності азоту в живильному середовищі (◆) і за його відсутності (◇). Тут і на рис. 2 фази вегетації: 1 — куцїння; 2 — вихід у трубку; 3 — колосїння; 4 — цвітїння; 5 — молочна стиглїсть

аксантину та антераксантину (див. рис. 1, г, д). У середньому за період від фази куцїння до молочної стиглості вміст кожного з цих ксантофілів зростає приблизно в 2,2–3 рази.

За нестачі азоту відзначалася дещо інша динаміка змін ксантофілів. Підвищення вмісту ксантофілів було менш значним і воно спостерігалось лише до фази колосїння, після чого їх кількість починала знижуватись (див. рис. 1). Величина відношення максимального вмісту пігментів до мінімального за низького рівня азотного живлення дорівнювала 1,2–1,5. Проте, як і в контрольному варіанті, за нестачі азотного живлення найбільша частка в загальному пулі ксантофілів належала лютеїну, найменша — антераксантину. Вміст зеаксантину та антераксантину контрольних та дослідних варіантів достовірно не відрізнявся до фази цвітїння (див. рис. 1, г, д), а після неї, як і для інших, був нижчим за нестачі азотного живлення.

При аналізі вмісту ксантофілів у розрахунку на мг хлорофілу виявилось, що на динаміку і відносний вміст лютеїну, віолаксантину та неоксантину рівень азотного живлення практично не впливав (рис. 2, а–в). У той же час відносний вміст зеаксантину при нестачі азотного живлення був достовірно вищим, ніж у рослин з кращим рівнем забезпеченості азотним живленням, зі збереженням позитивної динаміки змін у процесі вегетації (див. рис. 2, г). Подібні за характером зміни спостерігали і для вмісту антераксантину (див. рис. 2, д), але через низькі значення цього пігменту вони були недостовірними.

Таким чином, незважаючи на зменшення абсолютної кількості ксантофільних пігментів за умов дефіциту азоту, відносний вміст лютеїну, віолаксантину та неоксантину, які в сумі складають понад 80% загального пулу ксантофілів, не відрізнявся за різних умов азотного живлення. Достовірно зростає лише відносний вміст зеаксантину. Підвищення вмісту антераксантину, як зазначено вище, було недостовірним. Отримані результати в цілому узгоджуються з даними літератури. Зокрема, Toth зі співавт. показали 7-кратне зростання

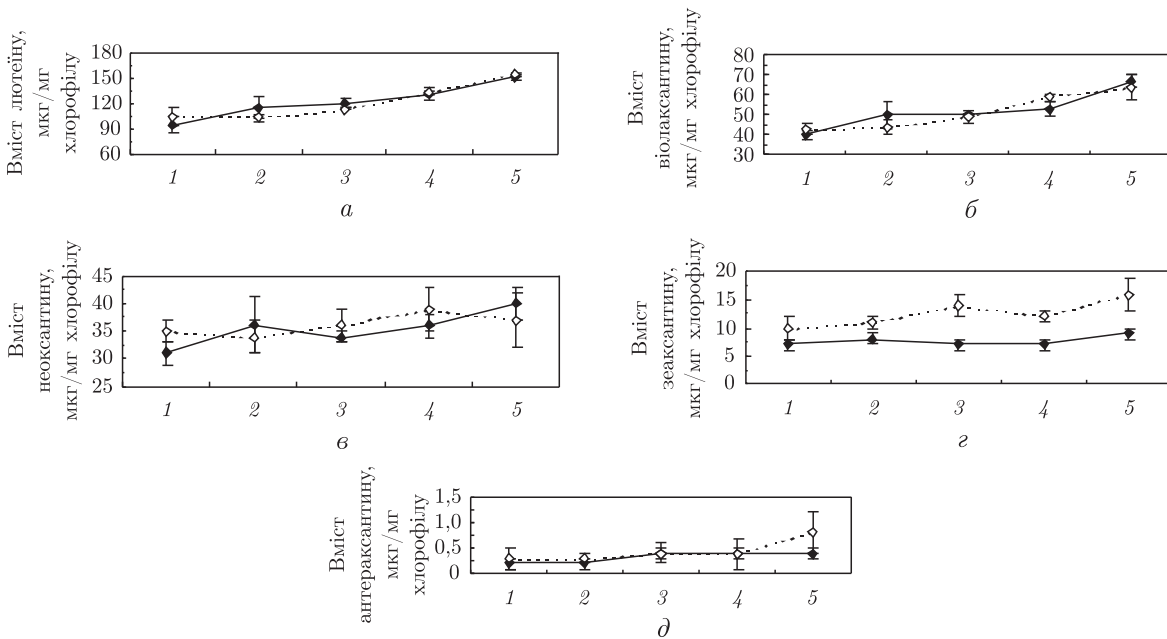


Рис. 2. Динаміка змін відносного вмісту окремих ксантофілів у процесі вегетації за наявності азоту в живильному середовищі (◆) і за його відсутності (◇)

відносної кількості зеаксантину та 3-кратне — антераксантину у відібраних перед світанком (інтенсивність освітлення  $250 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ ) листках рослин кукурудзи на початку репродуктивного періоду за дефіциту азотного живлення [13]. Збільшення їх вмісту за дії іншого стресу — засолення — відмічено також у листків сорго при невисокій інтенсивності освітлення ( $100 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ ) [14].

Відомо, що за умов надлишкової для фотосинтезу інтенсивності світла зеаксантин сприяє фотозахисту тилакоїдних мембран хлоропластів, перехоплюючи енергію від збудженого хлорофілу і перешкоджаючи тим самим утворенню вільних радикалів [1, 2, 4]. Крім того, утворення на світлі зеаксантину з віолаксантину викликає структурну перебудову фотосинтетичних мембран, що призводить до теплового розсіювання поглинутої у надлишку енергії світла, чим забезпечується захист ФСII від фотоінгібування. Виявлене нами збільшення відносного вмісту ксантофілів, і, особливо, депоксидованих форм пігментів — зеаксантину та антераксантину, може свідчити про зростання їх захисної ролі за умов нестачі азотного живлення та при старінні листків впродовж вегетації рослин, коли інтенсифікуються процеси окиснення структурних та функціональних компонентів мембран.

1. Demming-Adams B., Gilmore A. M., Adams W. W. In vivo Function of Carotenoids in Higher Plants // FASEB J. – 1996. – No 10. – P. 403–412.
2. Havaux M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts // Trends Plant Sci. – 1998. – No 3. – P. 147–151.
3. Ourisson G., Nakatani Y. The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol // Chem. Biol. – 1994. – No 1. – P. 11–23.
4. Ruban A. V., Horton P. The Xanthophyll Cycle Modulates the Kinetics of Nonphotochemical Energy Dissipation in Isolated Light-Harvesting Complexes, Intact Chloroplasts, and Leaves of Spinach // Plant Physiol. – 1999. – 119, No 2. – P. 531–542.
5. Jin E. S., Yokthongwattana K., Polle J. E. W. et al. Role of the Reversible Xanthophyll Cycle in the Photosystem II Damage and Repair Cycle in *Dunaliella salina* // Ibid. – 2003. – 132, No 1. – P. 352–364.

6. Bungard R. A., Ruban A. V., Hibberd J. M. et al. Unusual carotenoid composition and a new-type of xanthophyll cycle in plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**, No 3. – P. 1135–1139.
7. Woitsch S., Römer S. Impact and interaction of lipophilic antioxidants in mutants and transgenic plants // J. Plant Physiol. – 2005. – **162**, No 11. – P. 1197–1209.
8. Сапожников Д. И. Пигменты пластид зеленых растений. Методика их исследования. – Москва; Ленинград: Наука, 1964. – 121 с.
9. Toth V. R., Meszaros I., Veres S. et al. Effects of the available nitrogen on the photosynthetic activity and xanthophyll cycle pool of maize in field // J. Plant Physiol. – 2002. – **159**, No 6. – P. 627–634.
10. Sharma P. K., Hall D. O. Changes in Carotenoid Composition and Photosynthesis in Sorghum under High Light and Salt Stress // Ibid. – 1992. – **140**, No 6. – P. 661–666.
11. Krol M., Spangford M. D., Huner N. P. A. et al. Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll-less barley mutant // Plant Physiol. – 1995. – **107**. – P. 873–883.
12. Murchie E. N., Chen M. Y.-Zh., Hubbart S. et al. Interaction between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice // Ibid. – 1999. – **119**, No 2. – P. 553–563.
13. Cardini F. Carotenoids in ripe green and autumn senescing leaves of apple tree: II. Seasonal changes of free carotenoids and xanthophyll esters and relationship between their content and senescing state // G. Bot. Ital. – 1983. – **117**, No 1–2. – P. 75–97.
14. Cardini F., Pucci S., Calamassi R. Quantitative variations of individual carotenoids in relationship with the leaflet development of six species of the genus *Ceratozamia* (Cycads) // J. Plant Physiol. – 2006. – **163**, No 1. – P. 128–140.
15. Прядкина Г. А., Лихолат Д. А. Идентификация ксантофиллов методом жидкостной хроматографии в изократическом режиме // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – **38**, № 1. – С. 75–81.

*Институт фізіології рослин і генетики  
НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 22.03.2007*