

УДК 581.132.144

## ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГРАНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ПРОГРЕВЕ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА В ТЕМНОТЕ И ПРИ НАЛИЧИИ СВЕТА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

О.Ю. БОНДАРЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины  
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Исследованы особенности изменений архитектуры гран хлоропластов после кратковременного воздействия высокой температуры на листья гороха в темноте и при наличии света низкой интенсивности. В результате анализа микроизображений хлоропластов, полученных методом электронной микроскопии ультратонких срезов, установлено, что кратковременный прогрев при температуре 45 °С изменяет форму, уменьшает размеры хлоропластов, увеличивает количество многотилакоидных гран, уменьшает площадь стыкованной части гранальных тилакоидов. Освещение светом низкой интенсивности смягчает воздействие высокой температуры на структуру хлоропластов.

*Ключевые слова:* *Pisum sativum* L., хлоропласты, гранальная система, тилакоиды, размеры, кратковременный прогрев, влияние света.

Фотосинтетический аппарат высших растений имеет ряд регуляторных механизмов, направленных на оптимизацию его работы при нестабильных или неблагоприятных условиях окружающей среды: засуха, действие высоких или низких температур, изменение интенсивности освещения. Хлоропласты — органеллы относительно высокой лабильности и стойкости при ответе на действие различных факторов. В результате изучения длительного воздействия высоких (нелетальных) температур и высокой интенсивности освещения на фотохимические реакции, состояние фотосинтетических пигментов и ультраструктуру хлоропластов [4] выявлены разного рода деструктивные процессы, обусловленные гипертермическим воздействием на листья пшеницы. Длительное воздействие высоких температур вызывало увеличение размера хлоропластов, появление извилистых и разбухших тилакоидов, признаков повреждения мембран (обратный контраст), возрастание количества многотилакоидных гран. В наших исследованиях с помощью метода электронной микроскопии было показано, что кратковременный прогрев листьев при повышенных и высоких температурах в темноте приводит к уменьшению размеров хлоропластов, изменению их формы [1], а также к перестройкам мембранной системы, которые сопровождаются уменьшением количества малотилакоидных гран, увеличением количества многотилакоидных гран, смещением тилакоидов в гране в латеральном направлении, изменением метрических показателей разных областей грани и внутри-тилакоидного пространства (люмена) гранальных тилакоидов [2].

Известно, что свет может разнонаправленно влиять на устойчивость фотосинтетического аппарата к повышенной температуре. Освещение высокой интенсивности вызывает фотоингибирование даже при оптимальной температуре. В условиях, когда высокая температура ограничивает фотохимическую утилизацию энергии квантов, свет низкой интенсивности провоцирует окислительное повреждение фотосинтетического аппарата [13–15]. Однако некоторые ученые считают, что свет смягчает воздействие высоких температур на функциональную активность растений гороха и ячменя [10, 11]. В наших предыдущих работах показано, что прогрев при наличии света низкой интенсивности способствует сохранению размеров изолированных хлоропластов [5] и активности фотосистемы II (ФС II) в листьях [8].

Целью настоящих экспериментов была проверка гипотезы, согласно которой свет низкой интенсивности предотвращает нарушение структуры мембранной системы хлоропластов. Для этого были получены электронно-микроскопические изображения ультратонких срезов листьев гороха, подвергавшихся кратковременному прогреву при наличии и отсутствии света низкой интенсивности, и проанализирован эффект слабого света на степень изменения параметров архитектуры фотосинтетических мембран хлоропластов при прогреве.

### Методика

Растения гороха (*Pisum sativum* L.) выращивали в сосудах на почвенной смеси в условиях вегетационной площадки. Средняя дневная температура составляла 19 °С, освещенность — 22,5 клк.

Для прогрева полностью сформированные листья гороха второго яруса растений помещали в плоскодонный тонкослойный прозрачный пластиковый стакан, сверху располагали такой же стакан меньшего диаметра, затем эту конструкцию опускали в водяной термостат, в верхний стакан добавляли воду соответствующей температуры для более равномерного прогрева листьев. Прогрев осуществляли в течение 5 мин при температуре 45 °С в темноте и при освещении интенсивностью 10 клк. Для освещения использовали лампу накаливания «OSRAM-200», образцы от лампы накаливания отделяли водяным фильтром толщиной 5 см для устранения дополнительного их нагрева инфракрасным светом. Контрольные листья также помещали в стакан, но выдерживали их в течение 5 мин при температуре и освещенности, соответствующих условиям выращивания. Из контрольных и прогретых при различных условиях освещения листьев брали выечки со средней их части. Полученный материал фиксировали 3 %-м глутаральдегидом в какодилатном буфере с последующей дофиксацией 1 %-м OsO<sub>4</sub> (Sigma, США), в том же буфере на холоде (+4 °С). После фиксации образцы обезвоживали этанолом и ацетоном, пропитывали смесью эпоновых смол и аралдита в соотношении 4 : 1 [9]. Пропитку и полимеризацию проводили в порядке, описанном в работе [1]. Для получения ультратонких срезов использовали микротом SELMI (Украина). Изображения получали в цифровом виде на микроскопе JEOL (Япония). Срезы контрастировали свинцом по методу Карновского [12]. Для морфометрических исследований хлоропласты на снимках выбирали случайным образом в количестве 20–30 штук на каждый вариант. Для получения метрических характеристик хлоропластов, гран и тилакоидов использовали программу MapInfo, модифициро-

ванную для микроизображений. В таблице приведены средние значения и стандартные отклонения.

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены микроизображения хлоропластов листьев гороха контрольного образца и вариантов, прогретых в течение 5 мин при 45 °С в темноте и при наличии света интенсивностью 10 клк. Визуальные наблюдения показали, что при прогреве в темноте изменяется форма органеллы на более округлую, появляется большое количество крахмальных зерен и липидных капель. Прогрев хлоропластов при наличии света интенсивностью 10 клк вызывал похожие изменения формы хлоропласта, но в меньшей степени. Наблюдаемое при этом увеличение количества крахмальных зерен и липидных капель было статистически недостоверным.

Рис. 2 иллюстрирует перестройку гранальной системы в хлоропластах под влиянием разных вариантов прогрева. Прогрев в темноте вызывал увеличение многотилакоидных образований, появление сдвигов гранальных тилакоидов и самих гран относительно друг друга. На изображениях большинства гран заметны места расстыковок тилакоидов и разбухание их люмена в краевой части. Прогрев при наличии света интенсивностью 10 клк приводил к сходным изменениям архитектуры фо-

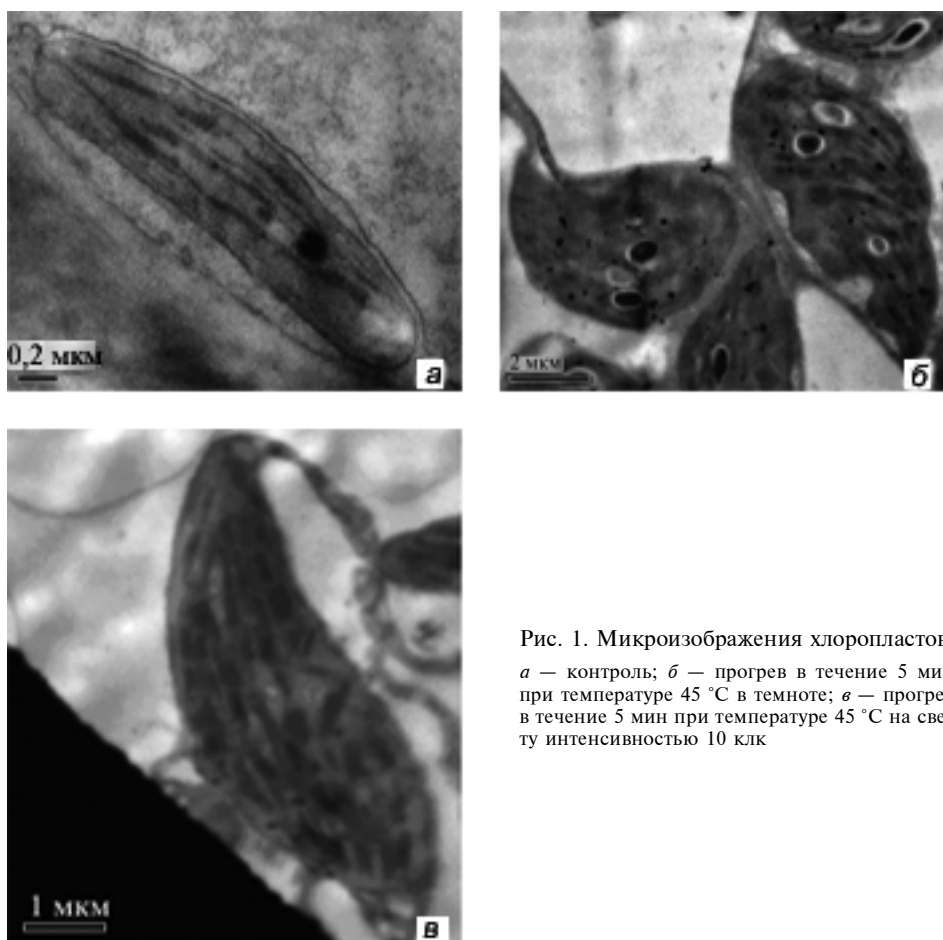


Рис. 1. Микроизображения хлоропластов:  
*a* — контроль; *б* — прогрев в течение 5 мин при температуре 45 °С в темноте; *в* — прогрев в течение 5 мин при температуре 45 °С на свету интенсивностью 10 клк

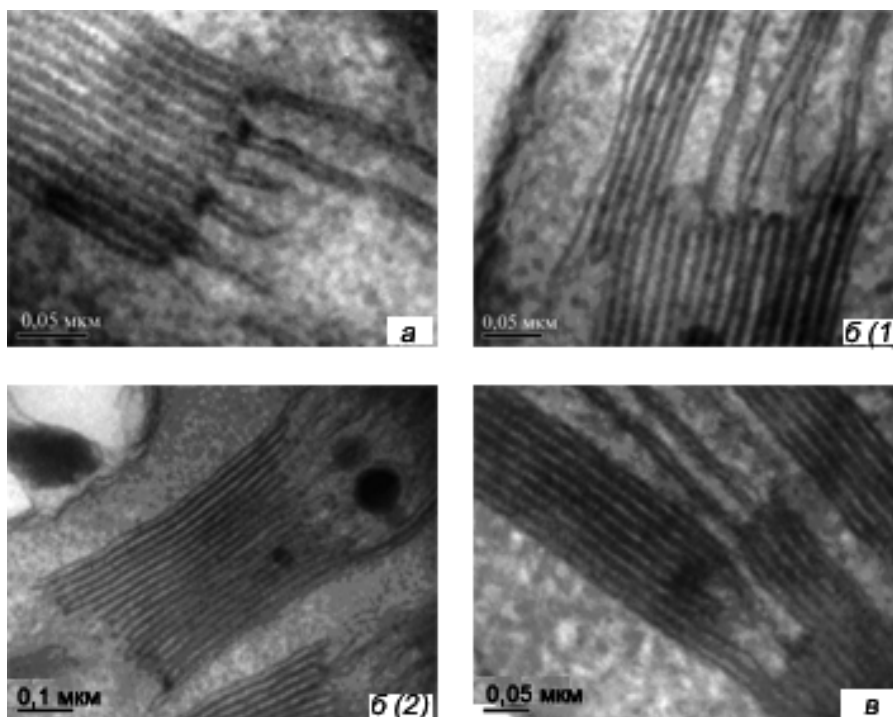


Рис. 2. Микроизображения гран хлоропластов:

*a* — контроль; *б* — прогрев в течение 5 мин при температуре 45 °С в темноте (*1* — место слияния гран; *2* — грана); *в* — прогрев в течение 5 мин при температуре 45 °С на свету интенсивностью 10 клк

тосинтетических мембран с вариантом прогрева в темноте с тем отличием, что в пределах грани в стыкованной части видимых изменений не было, а высота люмена гранальных тилакоидов была практически неизменной по всей их длине.

Результаты метрического анализа микроизображений хлоропластов листьев гороха приведены в таблице. Кратковременный прогрев в темноте вызывал уменьшение размеров хлоропластов в среднем на 22 %. Подобный эффект наблюдали и в случае прогрева изолированных хло-

*Изменение метрических показателей хлоропластов при кратковременном прогреве при 45 °С в темноте и на свету интенсивностью 10 клк*

Показатель	Контроль	Прогрев при 45 °С в темноте	Прогрев при 45 °С на свету, 10 клк
Площадь хлоропласта, мкм <sup>2</sup>	20,45±1,05	16,01±0,93	18,10±1,10*
Оси хлоропласта, мкм	6,53±0,40 1,58±0,20	4,72±0,15 2,51±0,30	6,19±0,40* 1,80±0,20*
Длина тилакоида грани, мкм	0,462±0,170	0,420±0,150	0,456±0,250
Протяженность стыкованной части гранальных тилакоидов, %	96,00±1,40	84,30±5,00	87,00±2,80*
Площадь краевой области, % площади грани	10,00±1,50	19,00±3,70	16,0±3,00*

\**p* < 0,05 по сравнению с вариантом прогрева в темноте.

ропластов [5]. На изображениях неизолированных хлоропластов можно было наблюдать и изменение формы хлоропласта (см. рис. 1), которая при прогреве менялась на более округлую. Среднее соотношение короткой и длинной осей органелл составляло 0,24 в контрольном варианте и 0,53 после пятиминутного прогрева при 45 °С. Аналогичные данные получены при изучении изменений формы и размеров хлоропластов в случае кратковременного прогрева при 25 и 35 °С в темноте в работе [1].

В случае прогрева при 45 °С и наличии света низкой интенсивности изменения были той же направленности, что и при прогреве в темноте, с отличием в степени реакции. Размеры хлоропластов уменьшались в среднем на 12 % по сравнению с контрольным вариантом, а соотношение осей органеллы увеличивалось незначительно и в среднем равнялось 0,29. Эти результаты дают основание сделать вывод, что свет низкой интенсивности уменьшает влияние прогрева на метрические показатели хлоропластов.

Интерес представляло сравнение изменений метрических параметров системы фотосинтетических мембран хлоропластов, которыми сопровождалось уменьшение размеров хлоропластов при кратковременном прогреве при температуре 45 °С в темноте и на свету низкой интенсивности. Как известно, высокая температура приводила к увеличению количества тилакоидов в гране, появлению мест сдвига гран относительно друг друга и относительно длинной оси хлоропласта [2, 3]. Кратковременное влияние высокой температуры при наличии света сопровождалось таким же эффектом. Детальный анализ метрических показателей грани в целом и гранальных тилакоидов в отдельности показал, что при прогреве в темноте длина гранального тилакоида уменьшается в большей степени, чем при прогреве на свету. При прогреве в темноте краевые области относительно центральной утолщались, а при прогреве на свету утолщения не наблюдались (см. рис. 2, в).

Исследованы также изменения протяженности стыковки—расстыковки гранальных тилакоидов. При прогреве в течение 5 мин при 45 °С в темноте и на свету низкой интенсивности протяженность стыкованной части уменьшалась и, соответственно, краевая часть увеличивалась. В контроле стыкованная часть составляла  $96 \pm 1$  % длины гранального тилакоида. При прогреве в темноте этот показатель уменьшался до  $84 \pm 3$  %. Показатель протяженности стыкованной части гранальных тилакоидов при прогреве на свету был средним между контрольным и прогретым в темноте вариантами и составлял  $87 \pm 3$  % длины тилакоида. Обратной стыкованной части изменялась площадь краевой области, которая в контроле составляла  $10 \pm 4$  %, при прогреве при 45 °С в течение 5 мин в темноте —  $19 \pm 4$  %, при прогреве при 45 °С в течение 5 мин на свету интенсивностью 10 клк —  $16 \pm 5$  % всей площади грани. Эти данные объясняют изменения выхода легких фрагментов краевых (маргинальных) частей грани, описанные в работах по изучению изменения выхода частиц разных областей грани методом дигитониновой фрагментации при кратковременном воздействии на изолированные хлоропласты высокой температуры в темноте и на свету [6, 7]. В этих экспериментах наблюдали следующие изменения выхода частиц, происходящих из краевых участков гран хлоропластов: прогрев при температуре 45 °С суспензии хлоропластов в темноте увеличивал выход краевых участков в среднем на 65—70 % относительно контроля, а при наличии света низкой интенсивности этот показатель снижался до 25—30 % [6, 7].

Таким образом, прогрев при 45 °С в темноте приводил к уменьшению площади хлоропластов, изменению их формы на более округлую (см. рис. 1), что подтверждается уменьшением соотношения осей хлоропластов на изображениях (прямых, соединяющих точки, наиболее и наименее отдаленные по длине и ширине эллипсоида органеллы). В последующих экспериментах по изучению влияния кратковременного прогрева в условиях низкой освещенности (10 клк) выявлены изменения формы и размеров хлоропластов такой же направленности, что и при прогреве в темноте, с тем отличием, что прогрев на свету низкой интенсивности вызвал более слабую реакцию. Параметры метрического анализа системы фотосинтетических мембран на микроизображениях хлоропластов из листьев гороха, прогретых при температуре 45 °С на свету интенсивностью 10 клк, занимали среднее положение между контрольным вариантом и вариантом кратковременного прогрева листьев в темноте. Это дает основание считать, что свет низкой интенсивности смягчает повреждающее действие кратковременного прогрева листьев при высокой температуре.

Возможно, причиной положительного воздействия света на сохранение структуры хлоропластов является энергетическая поддержка репарации ФС II. Известно, что, будучи поврежденными, комплексы ФС II мигрируют в периферическую часть тилакоидов. При этом нарушается их взаимодействие со светособирающими комплексами (ССК II), что, в свою очередь, может влиять на стыковку гран. Можно предположить, что наличие света низкой интенсивности способствует репарации ФС II, возврату комплексов ФС II в центральную часть грани и сохранению функциональной структуры гран. Кроме того, поддержание транспорта электронов во время прогрева обеспечивает процесс регенерации пула антиоксидантов в хлоропластах, что предотвращает повреждение липидов и белков хлоропластов, увеличивая устойчивость последних к повышенным температурам.

1. *Бондаренко О.Ю.* Изменение размеров хлоропластов листьев гороха, индуцированное кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 1. — С. 79—83.
2. *Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В.* Изменения структуры хлоропластов листьев гороха, индуцированные кратковременным прогревом // Там же. — 2012. — **44**, № 3. — С. 265—269.
3. *Кислюк И.М., Буболо Л.С., Васюковский М.Д.* Увеличение длины и количества мембран тилакоидов в хлоропластах листьев пшеницы в результате теплового шока // Физиология растений. — 1997. — **44**, № 1. — С. 39—44.
4. *Кислюк И.М., Буболо Л.С., Палеева Т.В., Шерстнева О.А.* Термоиндуцированное увеличение устойчивости фотосинтетического аппарата пшеницы к совместному действию высокой температуры и видимого света. Фиксация CO<sub>2</sub>, фотосинтетические пигменты и ультраструктура хлоропластов // Там же. — 2004. — **51**, № 4. — С. 507—515.
5. *Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю.* Вплив короткочасного прогрівання за наявності світла на розміри хлоропластів гороху // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 1. — С. 61—66.
6. *Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю.* Динамические свойства структурных единиц хлоропластов. — Киев: Логос, 2010. — 176 с.
7. *Кочубей С.М., Шевченко В.В., Корнеев Д.Ю.* Структурная организация и функциональные особенности световой фазы фотосинтеза. — Киев: Логос, 2007. — 176 с.
8. *Шевченко В.В.* Свет низкой интенсивности защищает фотосистему II от ингибирования при кратковременном прогреве // Физиология и биохимия культ. растений. — 2011. — **43**, № 6. — С. 527—532.
9. *Ширяев А.И.* Субмикроскопическая и макромолекулярная организация хлоропластов. — Киев: Наук. думка, 1978. — 160 с.

10. *Havaux M., Greppin H., Strasser R.* Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence of light // *Planta*. — 1991. — **186**. — P. 88–98.
11. *Kalituho L.N., Pshybytko N.L., Kabashnikova L.F., Jahns P.P.* Photosynthetic apparatus and high temperature: role of light // *Bulg. J. Plant Physiol.* — 2003. — Special iss. — P. 281–289.
12. *Karnovsky M.J.* Simple methods for «staining withlead» at high pH in electron microscopy // *J. Biophys. Biochem. Cyt.* — 1961. — **11**. — P. 729–732.
13. *Leakey A.D.V., Press M.C., Scholes J.D.* High-temperature inhibition of photosynthesis is greater under sun-flecks than uniform irradiance in a tropical rain forest tree seedling // *Plant Cell Environ.* — 2003. — **26**. — P. 1681–1690.
14. *Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G.* Photoinhibition of photosynthesis in nature // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1994. — **45**. — P. 633–662.
15. *Powles S.B.* Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1984. — **35**. — P. 15–44.

Получено 15.04.2015

ЗМІНИ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ГРАНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ ХЛОРОПЛАСТІВ  
ЗА КОРОТКОЧАСНОГО ПРОГРІВАННЯ ЛИСТКІВ ГОРОХУ В ТЕМРЯВІ ТА  
ЗА НАЯВНОСТІ СВІТЛА НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

*О.Ю. Бондаренко*

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Досліджено особливості змін архітектури гран хлоропластів після короткочасної дії високої температури на листки гороху в темряві та за наявності світла низької інтенсивності. В результаті аналізу мікробіографій хлоропластів, отриманих методом електронної мікроскопії ультратонких зрізів, встановлено, що короткочасне прогрівання за температури 45 °C змінює форму, зменшує розміри хлоропластів, збільшує кількість багатотилакоїдних гран, зменшує площу стикованої частини гранальних тилакоїдів. Освітлення світлом низької інтенсивності зм'якшує дію високої температури на структуру хлоропластів.

CHANGES OF CHLOROPLASTS GRANA STRUCTURAL ORGANIZATION UNDER  
SHORT-TERM HEATING OF PEA LEAVES IN THE DARK AND AT THE PRESENCE  
OF LOW LIGHT

*O.Yu. Bondarenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Changes in the structure of granal thylakoids upon short-term treatment of pea leaves with elevated temperature either in the darkness or under the light of low intensity have been investigated. The analysis of images obtained using electron microscopy of ultra-thin sections implies that short-term warming-up at 45 °C modifies the shape and the size of chloroplasts, decreases the stacking area of the granal thylakoids. Illumination with low light alleviates the effect of high temperature stress on chloroplast structure.

*Key words:* *Pisum sativum* L., chloroplasts, grana system, thylakoids size, short-term heating, influence of light.