

УДК 581.1

## УЛЬТРАСТРУКТУРА ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ И ДЕЙСТВИИ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ

Ю. В. Венжик<sup>1</sup>, В. В. Таланова<sup>1</sup>, А. Ф. Титов<sup>1</sup>, Е. А. Мирославов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии Карельского научного центра РАН

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

На проростках пшеницы показано, что экзогенная абсцизовая кислота (АБК) не только вызывает дополнительный прирост устойчивости клеток листьев в процессе холодной адаптации (4 °С), но и модифицирует ультраструктуру хлоропластов. В частности, при закаливании пшеницы в присутствии экзогенной АБК (0,1 мМ) зафиксированы дополнительное увеличение площади хлоропластов, уплотнение стромы, образование выростов хлоропластов, а также изменения в тилакоидной системе пластид. Очевидно, что обнаруженные ультраструктурные изменения хлоропластов участвуют в формировании повышенной устойчивости клеток листьев, поддерживая и «фиксируя» определенную часть происходящих при этом функциональных изменений и обеспечивая тем самым более долгосрочную основу для адаптации растений к продолжительному действию низких температур.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** *Triticum aestivum* L., холодное закаливание, абсцизовая кислота, холодоустойчивость, ультраструктура хлоропластов.

### **Yu. V. Venzhik, V. V. Talanova, A. F. Titov, E. A. Miroslavov. THE ULTRASTRUCTURE OF CHLOROPLASTS IN WHEAT DURING COLD ADAPTATION AND ABA INFLUENCE**

The study of wheat seedlings showed that exogenous abscisic acid (ABA) not only stimulated an additional increase of the leaf cells cold tolerance in the process of cold adaptation (4 °C) but also modified the ultrastructure of chloroplasts. In particular, the results gained during wheat hardening with exogenous ABA (0.1 mM) indicated an additional increase in the area and density of the chloroplasts stroma, formation of numerous invaginations in chloroplasts as well as changes in the plastids thylakoid system. It seems that most of the observed ultrastructural changes in chloroplasts are involved in the formation of an increased leaf cells tolerance and meant to “fix” and support a certain part of functional changes, promoting thereby the long-term cold tolerance of the plants.

**К e y w o r d s:** *Triticum aestivum* L., cold hardening, abscisic acid, cold tolerance, ultrastructure of chloroplasts.

#### **Введение**

Абсцизовая кислота (АБК), которую часто называют гормоном стресса, играет очень важную

роль в механизмах адаптации растений к различным неблагоприятным факторам внешней природы, включая низкие температуры [Титов, Таланова, 2009; Catalá, Salinas, 2010]. Установ-

лено, в частности, что формирование высокой устойчивости растений в процессе низкотемпературного закаливания сопровождается быстрым накоплением этого гормона [Титов, Таланова, 2009; Catalá, Salinas, 2010], а экзогенная АБК способна вызывать дополнительный, и очень заметный, прирост холодоустойчивости растений в этих условиях [Bakht et al., 2006; Титов, Таланова, 2009]. Механизмы, лежащие в основе данного явления, активно исследуются [Bakht et al., 2006; Титов, Таланова, 2009; Catalá, Salinas, 2010], но до сих пор не до конца раскрыты. Например, слабо изучено влияние АБК на фотосинтетический аппарат (ФСА) растений в условиях действия низкой температуры, хотя именно хлоропласты одними из первых реагируют на охлаждение [Kratsch, Wise, 2000; Crosatti et al., 2013]. Известно, что при холодной адаптации в листьях растений формируются хлоропласты так называемого «светового типа» – крупные пластиды с мелкими гранами [Kratsch, Wise, 2000; Венжик и др., 2012]. Такая структура хлоропластов имеет очевидное адаптивное значение для растений в условиях низкой температуры [Венжик и др., 2012], поскольку именно в мембранах гран локализуется фотосистема II, наиболее чувствительная к действию холода [Crosatti et al., 2013]. Логично ожидать, что предобработка растений экзогенной АБК, вызывающей дополнительный прирост холодоустойчивости при закаливании растений, может способствовать и ультраструктурной реорганизации хлоропластов. Подобное предположение подтверждается имеющимися в литературе сведениями о стабилизирующем влиянии АБК на функциональную активность ФСА при холодовом закаливании. Показано, например, что обработка АБК приводит к увеличению коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и максимального квантового выхода фотосистемы II у закаленных проростков люцерны [Zhou et al., 2006], а также стабилизирует уровень хлорофиллов и каротиноидов в листьях проростков риса, подвергнутых охлаждению [Flores-Nemedes et al., 1993]. Помимо этого установлено, что АБК влияет на экспрессию ряда генов, кодирующих белки и ферменты ФСА, в том числе рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу и протеины светособирающего пигментного комплекса [Медведев, Шарова, 2011; Yamburenko et al., 2013]. Однако в известной нам литературе отсутствуют данные, позволяющие судить о возможных ультраструктурных изменениях, происходящих в хлоропластах под влиянием АБК при низкотемпературном закаливании. В связи с этим нами изучено влияние экзогенной АБК на

холодоустойчивость клеток листа и ультраструктуру хлоропластов в процессе холодной адаптации пшеницы.

## Материалы и методы

Исследование выполнено с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН. опыты проводили на недельных проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенных на питательном растворе с добавлением микроэлементов (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. По достижении недельного возраста проростки подвергали воздействию низкой закалывающей температуры (4 °С) в течение 4 сут, сохраняя прочие условия эксперимента неизменными. Часть проростков за сутки до закаливания помещали на растворы АБК (0,1 мМ) (ICN, США).

О холодоустойчивости листьев судили по температуре ( $LT_{50}$ ), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листовых высечек после их 5-мин. промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР-02/–20 («Интертерм», Россия) [Балагурова и др., 1982]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью светового микроскопа ЛОМО Микмед-2 («ЛОМО», Россия) по коагуляции цитоплазмы и деструкции хлоропластов. Каждый опыт повторяли не менее трех раз с 6-кратной биологической повторностью.

Для электронно-микроскопического исследования брали высечки из средней трети пластинки 3–5 листьев и фиксировали их при температуре 0–4 °С 3%-м глютаровым альдегидом на фосфатном буфере (рН 7,2), а затем 2%-м раствором  $OsO_4$ . Обезвоженный в серии спиртов и ацетонов материал окрашивали уранилацетатом и заливали в смесь эпоксидных смол. Срезы палисадной паренхимы листьев получали на ультрамикротоме Ultracut («Reichert», Австрия), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Hitachi 600 («Hitachi», Япония) при увеличении 1000–25000. Морфометрический анализ ультраструктуры проводился на клетках 1-го субэпидермального слоя мезофилла по стандартным методикам [Венжик и др., 2012] на 25–50 хлоропластах в каждом варианте опыта. Коэффициент гранальности рассчитывали как отношение длины мембран тилакоидов в гранях к длине мембран, контактирующих со стромой.

В таблицах и на графиках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. О достоверности отличий судили с помощью критерия Стьюдента. В статье обсуждаются только величины, достоверные при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что под влиянием температуры 4 °С холодоустойчивость клеток листьев пшеницы возрастает уже в течение первых суток закаливания, достигая максимального в данных условиях уровня на 4-е сут (рис. 1). Экзогенная АБК вызывала дополнительный прирост устойчивости, которая уже через 24 ч от начала опыта заметно превышала максимальный уровень, достигнутый при закаливании без гормона в течение 4 сут. Затем до конца опыта устойчивость проростков, обработанных АБК, сохранялась неизменной (см. рис. 1).

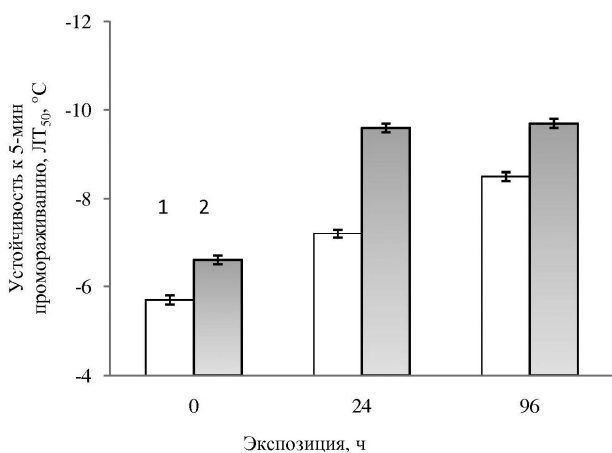


Рис. 1. Влияние АБК и температуры 4 °С на холодоустойчивость клеток листа у проростков пшеницы: 1 – 4 °С; 2 – 4 °С + АБК (0,1 мМ)

Ультраструктура хлоропластов у проростков пшеницы, выращенных при 22 °С, была типичной для этого вида растений: хлоропласты правильной линзовидной формы содержали мелкозернистую строму, в которой располагались многочисленные граны и хорошо развитая система межгранных тилакоидов (рис. 2, а). При закаливании (4 °С) проростков без АБК визуально отмечено уменьшение размеров гран (рис. 2, б), а также укрупнение самих хлоропластов и появление в них многочисленных инвагинаций (рис. 2, в). При совместном влиянии АБК и закалывающей температуры структура хлоропластов претерпевала дополнительные изменения: уже в течение первых 24 ч опыта наблюдалось заметное уплотнение стромы, а в хлоропластах отмечено появление выростов (рис. 2, г), которые называют стромулами [Gray et al., 2012]. В дальнейшем (спустя 4 сут) визуально зафиксировано «разбухание» хлоропластов (рис. 2, д), а около пластид появлялись скопления митохондрий и пероксисом (см. рис. 2, д, е).

Морфометрический анализ ультраструктуры хлоропластов позволил подтвердить, что под влиянием низкой температуры в клетках мезофилла пшеницы формируются хлоропласты «светового типа» – крупные, с мелкими гранями и низким коэффициентом гранальности, что свидетельствует о преобладании тилакоидов стромы над тилакоидами гран (табл.). У закаленных проростков, обработанных АБК, зафиксировано еще большее увеличение размеров пластид за счет площади их стромы (спустя 4 сут от начала опыта), а также увеличение количества гран и коэффициента гранальности (см. табл.).

Таким образом, предобработка растений пшеницы АБК не только индуцирует дополнительный прирост их устойчивости в процессе

### Влияние АБК и температуры 4 °С на ультраструктуру хлоропластов у проростков пшеницы

Экспозиция, ч	Площадь среза хлоропласта, мкм <sup>2</sup>	Площадь среза стромы, мкм <sup>2</sup>	Число гран на 10 мкм <sup>2</sup> среза хлоропласта (шт)	Число тилакоидов в гране (шт)	Коэффициент гранальности
22 °С					
0	7,9 ± 0,7	3,8 ± 0,2	37 ± 2	7 ± 0,2	1,3
24	9,2 ± 0,4	4,2 ± 0,1	34 ± 3	8 ± 0,3	1,2
96	11,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	35 ± 3	8 ± 0,4	1,2
4 °С					
0	7,9 ± 0,7	3,8 ± 0,2	37 ± 2	7 ± 0,2	1,3
24	13,9 ± 0,7a	7,5 ± 0,3a	28 ± 2a	6 ± 0,3a	1,0
96	12,4 ± 0,3a	7,3 ± 0,3a	26 ± 2a	6 ± 0,3a	1,0
4 °С + АБК					
0	7,9 ± 0,7	3,8 ± 0,2	37 ± 2	7 ± 0,2	1,3
24	13,8 ± 0,5	8,9 ± 0,3b	27 ± 4	8 ± 0,4b	1,4
96	15,9 ± 0,5b	9,2 ± 0,4b	45 ± 2b	6 ± 0,3	2,1

Примечание. а – отличия от проростков контрольного варианта (22 °С), достоверны при  $p \leq 0,05$ ; b – отличия от проростков, закалываемых без АБК (4 °С), достоверны при  $p \leq 0,05$ .

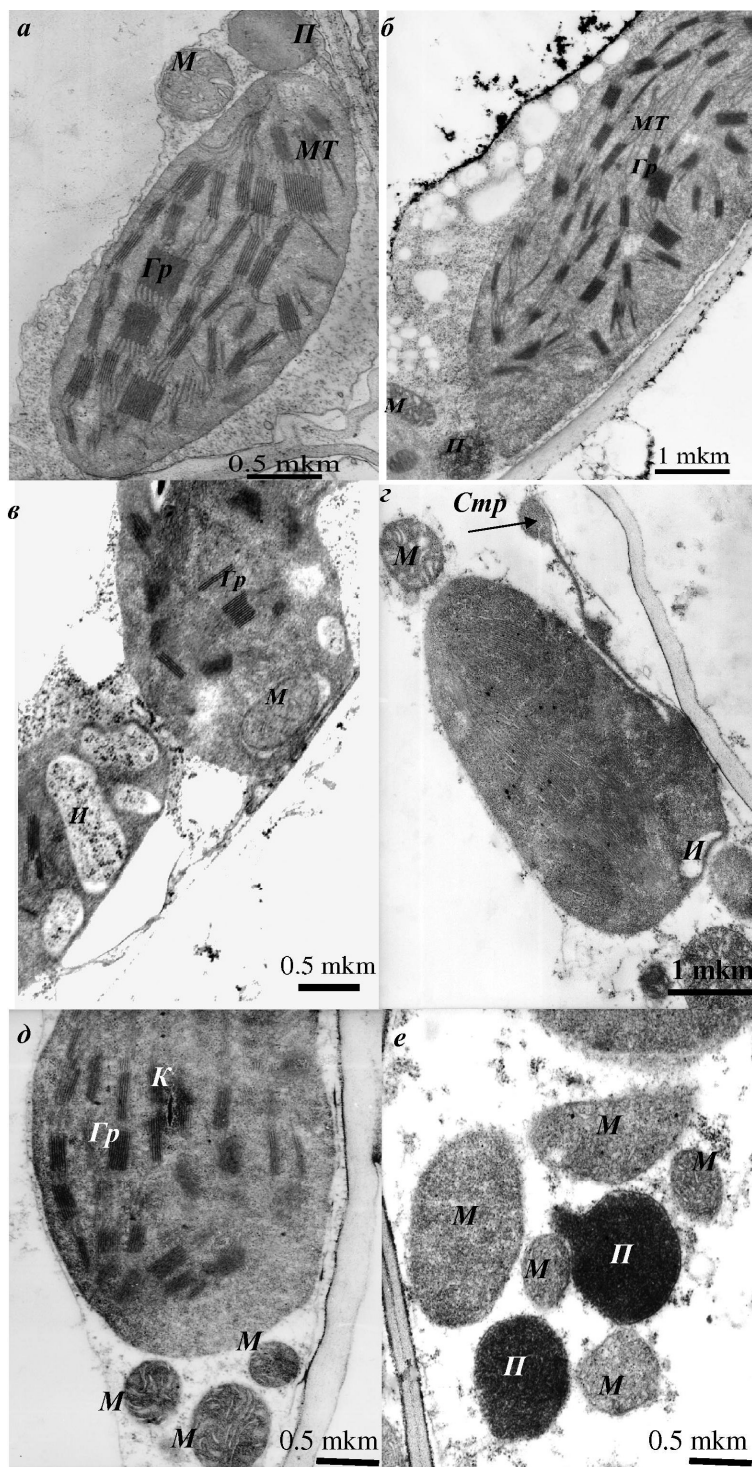


Рис. 2. Влияние АБК на ультраструктуру хлоропластов в клетках мезофилла закаленных (4 °С) проростков пшеницы: а – исходный вариант (22 °С); б, в – закаливание при 4 °С в течение 24 ч (б) и 96 ч (в); г, д, е – совместное влияние 4 °С + АБК (0,1 мМ) в течение 24 ч (г) и 96 ч (д, е); Гр – граны, МТ – межгранные тилакоиды, К – крахмальное зерно, Стр – стромулы (выросты хлоропласта), И – инвагинации, М – митохондрия, П – пероксисома

холодовой адаптации, но и заметно модифицирует ультраструктуру хлоропластов, сформированную в клетках листьев под влиянием низкой температуры. С одной стороны, экзогенная

АБК вызывает дополнительное увеличение размеров хлоропластов, а с другой – нарушает процесс формирования пластид по «световому типу», обуславливая рост коэффициента гра-



нальности. Существенное укрупнение пластид, вызванное гормоном, очевидно связано с оттоком воды из цитоплазмы в хлоропласты и накоплением в их стромах осмолитиков (дегидринов, пролина, сахарозы и др.), синтез которых усиливается под влиянием АБК [Медведев, Шарова, 2011]. С этим же может быть связано уплотнение стромы пластид, визуально выявляемое уже через 24 ч от начала опыта. Дополнительному увеличению поверхности хлоропластов способствуют выросты пластид (стромулы), образование которых усиливается под влиянием гормона [Gray et al., 2012]. Согласно имеющимся в литературе предположениям, стромулы, выполняя транспортную функцию, могут обеспечивать более интенсивный обмен метаболитами между хлоропластами, другими органеллами клетки и цитоплазмой [Gray et al., 2012]. Об усилении метаболизма свидетельствуют и многочисленные скопления митохондрий и пероксисом около пластид. Что касается влияния АБК на тилакоидную систему хлоропластов, подчеркнем, что увеличение коэффициента гранальности в ее присутствии происходит за счет формирования большего количества гран, но среднее число тилакоидов в гране при этом остается небольшим. В литературе имеются сведения о стабилизирующем действии АБК на мембраны, в том числе фотосинтетические [Chen, Li, 2002; Saibo et al., 2009; Theocharis et al., 2012]. Прежде всего стабилизация мембран под влиянием АБК происходит за счет усиления активности антиоксидантов, препятствующих перекисному окислению липидов [Chen, Li, 2002; Saibo et al., 2009; Theocharis et al., 2012]. Кроме того, АБК регулирует степень десатурации жирных кислот и текучесть мембран [Bakht et al., 2006; Catalá, Salinas, 2010], что немаловажно в условиях охлаждения. Мы можем также предполагать, что АБК способна влиять на процессы гранообразования, усиливая экспрессию генов, регулирующих синтез мембранных белков в условиях низкотемпературного закаливания.

Таким образом, в данной работе на примере озимой пшеницы впервые показано, что экзогенная АБК в условиях холодного закаливания вызывает ряд существенных изменений в ультраструктурной организации хлоропластов. Следовательно, можно утверждать, что прирост устойчивости, индуцируемый АБК, связан не только с различными функциональными (метаболическими) изменениями, но и с определенными структурными преобразованиями, в частности, с ультраструктурной реорганизацией ФСА.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 8050.*

## Литература

- Балагурова Н. И., Дроздов С. Н., Хилков Н. И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1982. 6 с.
- Венжик Ю. В., Титов А. Ф., Таланова В. В., Мирславцов Е. А., Котеева Н. К. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации // Цитология. 2012. Т. 54, № 12. С. 916–924.
- Медведев С. С., Шарова Е. И. Биология развития растений. В 2-х т. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. Том 1. 252 с.
- Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 203 с.
- Bakht J., Bano A., Dominy P. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effect on plasma membrane structure and function // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 3707–3715.
- Catalá R., Salinas J. Temperature-perception, molecules and mechanisms // J. Appl. Biomed. 2010. Vol. 8. P. 189–198.
- Chen W. P., Li P. H. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Environ. 2002. Vol. 25. P. 955–962.
- Crosatti C., Rizza F., Badeck F. W., Mazzucotelli E., Cattivelli L. Harden the chloroplast to protect the plant // Physiol Plant. 2013. Vol. 147. P. 55–63.
- Flores-Nemedes A. A., Dörffling K., Vergara B. S. Improvement of chilling resistance in rice by application of an abscisic acid analog in combination with the growth retardant tetcyclacis // Plant Growth Regul. 1993. Vol. 12. P. 27–34.
- Gray C. G., Hansen M. R., Shau D. J., Graham K., Dale R., Natesan S. K. A., Newell C. A. Plastid stromules are induced by stress treatments acting through abscisic acid // Plant J. 2012. Vol. 69. P. 387–398.
- Kratsch H. A., Wise R. R. The ultrastructure of chilling stress // Plant Cell Environ. 2000. Vol. 23, № 4. P. 337–350.
- Saibo N. J., Lourenço T., Oliveria M. M. Transcription factors and regulation of photosynthesis and related metabolism under environmental stresses // Ann Botany. 2009. Vol. 103. P. 609–623.
- Theocharis A., Clément Ch., Barka E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // Planta. 2012. Vol. 235. P. 1091–1105.
- Yamburenko M. V., Zubo Y. O., Vanková R., Kusnetsov V. V., Kulaeva O. N., Börner T. Abscisic acid represses the transcription of chloroplast genes // J. Exp. Bot. 2013. Vol. 64. P. 4491–4502.
- Zhou B., Guo Z., Lin L. Effects of abscisic acid application on photosynthesis and photochemistry of *Stylosanthes guianensis* under chilling stress // Plant Growth Regul. 2006. Vol. 48. P. 195–199.

## **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:**

### **Венжик Юлия Валерьевна**

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,  
Республика Карелия, Россия, 185910  
e-mail: Jul.Venzhik@gmail.com  
тел.: (8142) 762712

### **Таланова Вера Викторовна**

главный научный сотрудник, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,  
Республика Карелия, Россия, 185910  
e-mail: talanova@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 762712

### **Титов Александр Федорович**

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.  
руководитель лаб. экологической физиологии растений  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,  
Республика Карелия, Россия, 185910  
e-mail: titov@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 769710

### **Мирославов Евгений Аркадьевич**

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.  
Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН  
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197376  
e-mail: miroslavov@mail.ru  
тел.: (812) 3464477

### **Venzhik, Yuliya**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: Jul.Venzhik@gmail.com  
tel.: (8142) 762712

### **Talanova, Vera**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: talanova@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 762712

### **Titov, Alexandr**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,  
Karelia, Russia  
e-mail: titov@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 769710

### **Miroslavov, Evgeny**

Komarov Botanical Institute,  
Russian Academy of Sciences  
2 Popova St., 197376 St. Petersburg,  
Russia  
e-mail: : miroslavov@mail.ru  
tel.: (812) 3464477