

УДК 581.1

## ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРОВ ХЛОРОПЛАСТОВ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА, ИНДУЦИРОВАННОЕ КРАТКОВРЕМЕННЫМ ПРОГРЕВОМ

О.Ю. БОНДАРЕНКО

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

Методом электронной микроскопии исследовано изменение размеров хлоропластов листьев гороха, вызванное кратковременным действием повышенной температуры. Проведено сравнение с результатами аналогичных исследований, полученными ранее методом световой микроскопии для изолированных хлоропластов. Показано, что кратковременный (5 мин) прогрев листьев гороха в темноте при температурах 25 и 35 °С вызывает уменьшение размеров нативных хлоропластов. Величина изменения и его направленность такие же, как для изолированных хлоропластов, что доказывает аутентичность этого феномена, который не зависит от условий нахождения объекта.

*Ключевые слова:* *Pisum sativum* L., размер хлоропластов, прогрев хлоропластов, электронная микроскопия, световая микроскопия.

Хлоропласты — органеллы, весьма чувствительные к различного рода воздействиям окружающей среды. Разнообразные стрессы вызывают изменения структуры фотосинтетических мембран, которые могут проявляться в виде изменения размеров хлоропластов [6]. Например, свет высокой интенсивности сопровождается эффектом обратимого уменьшения объема хлоропластов *in vivo* [1]. С повышением интенсивности освещения степень реакции возрастает.

Исследования воздействия высоких температур показали, что длительный, трехчасовой и более прогрев при температуре около 42 °С растений пшеницы приводит к увеличению объема хлоропластов, появлению выростов и инвагинаций, изменению общей архитектоники тилакоидной системы [3]. По данным работы [2], кратковременное влияние высоких температур (10 мин) не изменяет ни форму, ни размеры хлоропластов в листьях пшеницы.

Ранее, работая с изолированными хлоропластами листьев гороха, мы обнаружили уменьшение их размеров при кратковременном прогреве суспензии [5]. Эффект был установлен при изучении изображений упомянутых органелл, полученных методом световой микроскопии. Однако возник вопрос, не связано ли это с тем, что эффект обнаружен для хлоропластов класса В, т.е. с нарушенной внешней оболочкой. Для решения вопроса мы исследовали влияние кратковременного прогрева на хлоропласты в целых листьях растений гороха методом электронной микроскопии. В этом случае объектом исследования были нативные хлоропласты.

Цель настоящей работы — установление изменения размеров хлоропластов листьев гороха, индуцированного кратковременным прогре-

вом, определение характера этого изменения методом электронной микроскопии, а также сравнительный анализ полученных данных с результатами аналогичного исследования, выполненного методом световой микроскопии на изолированных хлоропластах.

### Методика

Растения гороха (*Pisum sativum* L.) выращивали в сосудах на вегетационной площадке при оптимальной для данной культуры средней за весь период выращивания полуденной температуре 19 °С и освещенности 22 500 лк (температуру и освещенность измеряли на уровне растений ежедневно в полдень).

Для электронно-микроскопических исследований брали высечки из средней части полностью сформированного листа второго яруса 14-суточных растений гороха. Варианты: контроль; прогрев в течение 5 мин при 25 и при 35 °С в темноте. Для прогрева листья помещали в полиэтиленовый пакет и погружали в воду нужной температуры.

Прогретый и контрольный материал фиксировали 3 %-м глутаральдегидом в какодилатном буфере (рН 7,2) и 1 %-м OsO<sub>4</sub> (SIGMA) в том же буфере на холоде, после чего образцы обезвоживали этанолом и ацетоном. Для получения ультратонких срезов из фиксированных образцов их пропитывали смесью эпоновых смол и аралдита в соотношении 4 : 1 [8]. Пропитку и полимеризацию проводили в следующем порядке. В приготовленную смесь добавляли ацетон в соотношении 1 : 3 и пропитывали этой смесью образцы в течение 2—4 ч. Затем ее сливали, образцы снова помещали в такую же смесь, но уже в соотношении смолы : ацетон = 1 : 1, и пропитывали в течение 1 сут. Третий этап пропитки проводили в течение 6 ч в такой же смеси, но в соотношении смолы : ацетон = 3 : 1. После пропитки проводили поэтапную полимеризацию. Для этого залитые смесью эпоновых смол и аралдита с ускорителем (Fluka) образцы помещали в термостат при температуре 37 °С, через 12 ч температуру в термостате повышали до 60 °С и полимеризовали в течение следующих 12 ч.

Изображения в электронном микроскопе получали методом ультратонких срезов. Срезы, изготовленные ультрамикротомом УМТП-6М (Украина), контрастировали свинцом по методу Карновского [9]. Изображения, полученные с помощью микроскопа JEOL (Япония) записывали в цифровом виде. Для морфометрических исследований хлоропласты на снимках отбирали случайным образом в количестве 30 на каждый вариант. Для расчета размеров хлоропластов и соотношения длин осей этих органелл использовали программу MapInfo, модифицированную для микроизображений.

### Результаты и обсуждение

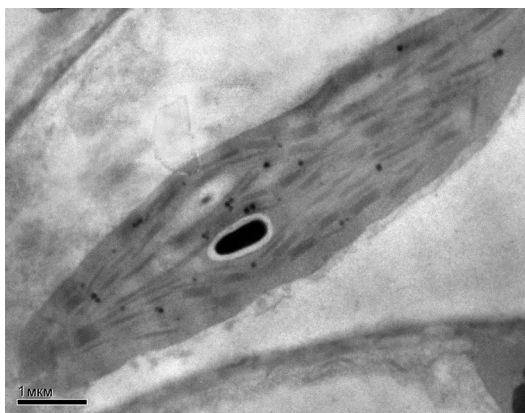
На электронных микроизображениях хлоропласты контрольных образцов и образцов, полученных после прогрева в темноте в течение 5 мин при 25 и при 35 °С представляли собой линзовидные тела с различной электронной плотностью. Хлоропласты листьев контрольных растений имели правильную линзовидную форму (рисунок, а). Их площадь составляла  $20,45 \pm 1,05$  мкм<sup>2</sup>, соотношение длин короткой и длинной осей —  $0,23 \pm 0,05$ . Граны контрольных хлоропластов содержали небольшое ко-

личество тилакоидов и были направлены вдоль длинной оси органеллы. На некоторых изображениях наблюдались крахмальные зерна — не более 1 на хлоропласт.

На микроизображениях срезов хлоропластов после 5 мин прогрева листьев в темноте при 25 °С выявлены следующие изменения: площадь хлоропластов уменьшалась на 9 % (таблица); соотношение длин осей увеличивалось на 26 % по сравнению с этим показателем у контрольных хлоропластов и составляло  $0,31 \pm 0,05$ ; количество крахмальных зерен увеличивалось до 2—3 на хлоропласт; появлялись граны с большим количеством тилакоидов; гранальные тилакоиды смещались друг относительно друга в латеральном направлении, чего не наблюдали в гранях контрольных хлоропластов (см. рисунок, б).

Результаты анализа изображений ультратонких срезов хлоропластов листьев, прогретых 5 мин в темноте при 35 °С, показали еще большее уменьшение их размеров (на 11 %) по сравнению с контрольными (см. рисунок, в); хлоропласты имели измененную форму с зауженными краями в области длинных осей, соотношение длин осей хлоропластов этого варианта равнялось  $0,44 \pm 0,08$  (см. таблицу), т.е. изменялось на 90 % по сравнению с контролем; количество крахмальных зерен увеличивалось до 3—4 на хлоропласт; граны представляли собой многотилакоидные образования, четкая ориентация их вдоль длинной оси отсутствовала (см. рисунок, в).

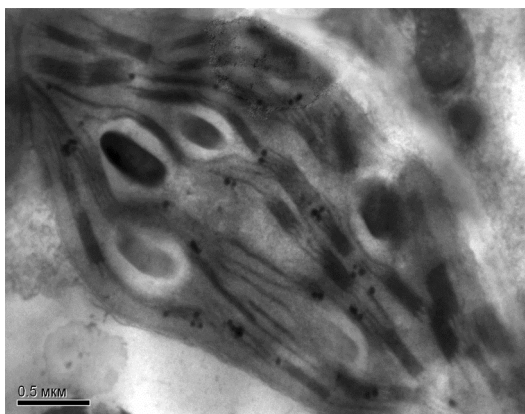
Ранее мы обнаружили уменьшение площади изолированных хлоропластов, прогретых 5 мин при 25 и при 35 °С соответственно на 9 и на 17 %, соотношение длин



а



б



в

Хлоропласты листьев гороха:

а — контроль; б — прогрев 5 мин при 25 °С; в — прогрев 5 мин при 35 °С

*Изменения размеров хлоропластов, индуцированные кратковременным действием повышенной температуры*

Образец	Световой микроскоп		Электронный микроскоп	
	S, мкм <sup>2</sup>	d/d <sub>1</sub>	S, мкм <sup>2</sup>	d/d <sub>1</sub>
Контроль	16,0 ± 2,1	0,71 ± 0,08	20,45 ± 1,05	0,23 ± 0,05
Прогрев				
при 25 °С	14,6 ± 1,9	0,68 ± 0,05	18,60 ± 0,24	0,31 ± 0,05
при 35 °С	13,3 ± 1,6	0,62 ± 0,06	18,23 ± 0,37	0,44 ± 0,08

осей хлоропластов уменьшалось соответственно на 5 и на 12 % [5]. Сравнением данных, полученных для нативных хлоропластов в листьях и для изолированных хлоропластов с частично нарушенной внешней оболочкой, доказано, что в обоих случаях прогрев вызывает уменьшение их размеров, возрастающее по мере повышения температуры прогрева. Степень уменьшения размеров была практически одинаковой для обоих случаев — на 9 и на 11–17 % при прогреве соответственно при 25 и при 35 °С. Соотношение осей более существенно изменялось у нативных хлоропластов — на 26 и 90 % в случае прогрева при 25 и при 35 °С по сравнению с 5 и 12 % у изолированных хлоропластов, хотя эти изменения были разнонаправленными.

При электронно-микроскопических исследованиях обнаружены изменения в организации гран: увеличивалось количество тилакоидов в них, тилакоиды в гране смещались в латеральном направлении, менялось расположение гран относительно осей хлоропласта. Возможно такие изменения являются одной из причин уменьшения размеров хлоропластов при прогреве. Интересно, что при кратковременном прогреве листьев в хлоропластах увеличивается количество крахмальных зерен, причем с повышением температуры прогрева эффект нарастает; это очевидно указывает на закономерность появления феномена.

Отметим, что в работах по исследованию влияния кратковременного прогрева на характеристики хлоропластов листьев пшеницы изменения размеров и формы хлоропластов не обнаружены [4, 7]. Можно предположить, что причина различия результатов состоит в специфике реакции растений разных экологических групп: пшеница относится к группе жаростойких растений, горох — растение, адаптированное к более низким температурам произрастания.

1. Веселовский В.А., Лецинская Л.В., Маркарова Е.Н. и др. Влияние освещенности листьев хлопчатника на теплоустойчивость фотосинтетического аппарата // Физиология растений. — 1976. — 23, № 3. — С. 467–472.
2. Кислюк И.М., Буболо Л.С., Быков О.Д. и др. Защитное и повреждающее действие видимого света на фотосинтетический аппарат пшеницы при гипертермии // Там же. — 2008. — 55, № 5. — С. 681–689.
3. Кислюк И.М., Буболо Л.С., Васьковский М.Д. Увеличение длины и количества мембран тилакоидов в хлоропластах листьев пшеницы в результате теплового шока // Там же. — 1997. — 44, № 1. — С. 39–44.
4. Кислюк И.М., Буболо Л.С., Каменцева И.Е. и др. Тепловой шок увеличивает терморезистентность фотосинтетического транспорта электронов, количество мембран и липидов в хлоропластах листьев пшеницы // Там же. — 2007. — 54, № 4. — С. 517–525.
5. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю. Влияние кратковременного прогрева на изменения размеров хлоропластов гороха // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — 40, № 2. — С. 126–133.

6. *Силаева А.М.* Ультраструктурная организация фотосинтетического аппарата и ее адаптационные и патологические процессы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1984. — 48 с.
7. *Шаркова В.Е., Буболо Л.С.* Влияние теплового стресса на структуру тилакоидной системы хлоропластов в клетках зрелых листьев пшеницы // Физиология растений. — 1996. — **43**, № 3. — С. 407—417.
8. *Ширяев А.И.* Субмикроскопическая и макромолекулярная организация хлоропластов. — Киев: Наук. думка, 1978. — 160 с.
9. *Karnovsky M.J.* Simple methods for «staining with lead» at high pH in electron microscopy // J. Biophys. Biochem. Cyt. — 1961. — **11**. — P. 729—732.

Получено 29.07.2009

ЗМІНА РОЗМІРІВ ХЛОРОПЛАСТІВ ЛИСТКІВ ГОРОХУ, ІНДУКОВАНА  
КОРОТКОЧАСНИМ ПРОГРІВАННЯМ

*О.Ю. Бондаренко*

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Методом електронної мікроскопії досліджено зміну розмірів хлоропластів листків гороху, спричинену короткочасною дією підвищеної температури. Дані порівняно з результатами аналогічних досліджень, отриманих раніше методом світлової мікроскопії для ізольованих хлоропластів. Показано, що короткочасне (5 хв) прогрівання листків гороху в темряві за температур 25 і 35 °С призводить до зменшення розмірів нативних хлоропластів. Величина зміни та її спрямованість такі самі, як для ізольованих хлоропластів, що доводить аутентичність цього феномену, який не залежить від умов знаходження об'єкта.

CHANGES OF PEA LEAVES CHLOROPLASTS SIZE INDUCED BY SHORT-TERM  
HEATING

*O.Yu. Bondarenko*

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

By method of electronic microscopy it was shown, that short-term heating of pea leaves, 5 minutes at temperatures 25 and 35 °C in darkness, led to a decrease of the size of the intact chloroplasts. The amplitude of changes and their direction were the same, as for isolated chloroplasts in the similar experiments which have been carried out with use of a method of light microscopy. It proves authenticity of this phenomenon which is independent from the environment of object.

*Key words:* *Pisum sativum* L., chloroplasts, heat stress, electronic microscopy, light microscopy.