

А.Ф. ПОПОВА

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев
E-mail: cell@svitonline.com

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ГАЛАКТОЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ *CHLORELLA* ПРИ КЛИНОСТАТИРОВАНИИ



Проведены исследования ультраструктуры хлоропластов клеток *Chlorella*, культивируемых продолжительное время в условиях медленного горизонтального клиностаტიрования. Выявлены различные изменения структурной организации хлоропластов, касающиеся количества и размера крахмальных зерен, электронной плотности стромы, а также мембранной системы хлоропластов клеток. Отмечено появление более значительных по сравнению с контрольным вариантом изгибов пучков тилакоидов в стромах хлоропластов и их более рыхлое расположение в пучках, а также появление неравномерных расширений меж- и интратилакоидного пространства. С учетом значимости галактолипидов как важных составляющих компонентов фотосинтетических мембран определено содержание как общих галактолипидов, так и моно- и дигалактозилдиацилглицеридов (МГДГ и ДГДГ) в клетках *Chlorella*. Высказано предположение, что статистически достоверное увеличение содержания галактолипидов, особенно МГДГ, может быть одной из причин ультраструктурных перестроек мембранной системы хлоропластов клеток *Chlorella* в условиях измененной гравитации.

© А.Ф. ПОПОВА, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 2

Введение. Результаты экспериментов с двумя штаммами зеленой одноклеточной водоросли *Chlorella*, культивируемой различное по продолжительности время в условиях микрогравитации, свидетельствуют о появлении различных ультраструктурных перестроек клеточных органелл по сравнению с контролем [1]. При этом степень ультраструктурных изменений коррелировала, прежде всего, с длительностью роста культуры в условиях космического полета. Наиболее существенным изменениям подвергались энергетические органеллы — митохондрии и хлоропласты. Так, в краткосрочных экспериментах (до 5 сут) отмечали только незначительные перестройки отдельных митохондрий клетки.

С увеличением продолжительности выращивания культуры *Chlorella* в условиях микрогравитации большинство митохондрий клеток опытных вариантов испытывали определенные изменения относительно их размера, электронной плотности матрикса, размера и топографии крист. Особенно значительные перестройки зарегистрированы в ультраструктуре хлоропластов в длительных экспериментах [2]. Наряду с уменьшением количества и размера крахмальных зерен как в стромах хлоропластов, так и в амилогенной обкладке пиреноидов, снижением электронной плотности стромы отмечали появление значительных перестроек мембранной системы пластид. Это проявлялось в усилении извилистости по сравнению с контролем, пучков тилакоидов, а также более рыхлом расположении тилакоидов в пучках. Кроме того, часто отмечали формирование расширений меж- и интратилакоидного пространства тилакоидов, в результате чего ширина пучков значительно варьировала.

Подобные изменения мембранной системы, в частности формирование раздутых стромальных тилакоидов, были выявлены в клетках семядолей у растений *Arabidopsis*, выращенных в условиях микрогравитации [3].

Наряду со структурными перестройками мембранной системы хлоропластов в условиях микрогравитации ряд авторов выявили изменения и в жирно-кислотном составе липидов растений, выращенных в условиях космического полета [4] и клиностаტიрования [5]. Известно, что липиды как компоненты мембран поддаются как количественным, так и качест-



Рис. 1. Фрагмент клетки *Chlorella* с хлоропластом (а) и фрагмент хлоропласта (б). Контроль. Хл — хлоропласт; ПТ — пучки тилакоидов; КЗ — крахмальное зерно. Масштаб: а — 1 мкм; б — 0,1 мкм

венным изменениям, которые имеют адаптивный или деструктивный характер [6].

Принимая во внимание, что галактолипиды (галактозосодержащие липиды) являются важным структурным компонентом фотосинтетических мембран хлоропластов [7], мы предположили, что перестройки ультраструктурной организации тилакоидной системы хлоропластов клеток *Chlorella* в условиях измененной гравитации могут быть обусловлены изменениями количества и соотношения разных классов галактолипидов.

Ввиду технических трудностей получения необходимого для биохимических исследований количества культуры *Chlorella*, выращенной в условиях микрогравитации, и соблюдения при отборе материала требуемого температурного режима, мы исследовали содержание галактолипидов в клетках *Chlorella* в условиях клиностатирования. Это позволяет воспроизводить некоторые эффекты микрогравитации, хотя в подобных условиях невозможно избавиться от скалярной составляющей гравитации.

Материал и методы. Исследования выполнены с использованием штамма ЛАРГ-1 культуры *Chlorella vulgaris* L. при выращивании ее в гетеротрофном режиме. Это позволило избежать каких-либо отклонений в режиме освещения культуры при вращении ее на клиностатах. В работе использовали медленные горизон-

тальные клиностаты со скоростью вращения 2 об/мин. Культивирование *Chlorella* осуществляли на твердой агаризованной среде (с 2 % агара) с органическими добавками. Продолжительность экспериментов составляла 30 сут. Повторность опытов трехкратная.

Для электронно-микроскопических исследований культуру *Chlorella* фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере (рН 7,0) в течение 5 ч при комнатной температуре. Постфиксацию осуществляли 1,0%-ным раствором тетраоксида осмия на том же буфере в течение 2 ч при 4 °С. Образцы обезживали спиртами восходящей концентрации и заключали в смесь эпон-аралдита согласно стандартной методике. Ультратонкие срезы исследовали и фотографировали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM 1200EX («Jeol», Япония).

Содержание галактолипидов (общих, классов моно- и дигалактозилдиацилглицеридов) определяли методом тонкослойной хроматографии с использованием силикогеля LC (5/40 мкм, Чехия). Количество галактолипидов рассчитывали по методу [8].

Результаты исследований и их обсуждение. Ультраструктура контрольных клеток была характерной для стационарной фазы развития культуры [1]. Клетка содержала единственный чашевидный хлоропласт, занимающий до 40 % ее объема и многочисленные крахмальные зерна различного размера, так как клетки исследуемого штамма принадлежат к крахмалноносному типу. Мембранная система хлоропласта представлена пучками тилакоидов (по 2—5 тилакоидов в пучке), локализованных в стромах хлоропластов между крахмальными зернами (рис. 1, а, б). Граны не типичны для хлоропластов клеток данной водоросли.

Ультраструктура хлоропластов в клетках *Chlorella*, растущих непродолжительное время (до 5 сут) в условиях клиностатирования, была подобна их ультраструктуре в контрольном варианте.

Результаты длительных экспериментов (30 сут), выполненных в этих условиях, свидетельствуют о существенных перестройках ультраструктуры хлоропластов. Наряду с изменениями соотношений относительного объема фотосинтетических мембран, стромы

и крахмала к общему объему хлоропласта отмечены нарушения топографии тилакоидов и их структуры. Изгибы тилакоидов были более извилистыми по сравнению с контрольным вариантом. Нередко тилакоиды в пучках были рыхло расположены, что изменяло профиль пучков, причем отдельные тилакоиды выходили за пределы пучков (рис. 2). При этом наблюдали появление расширений как меж-, так и интратилакоидного пространства, которые на отдельных участках были значительными (рис. 3, а, б).

Как общее содержание галактолипидов, так и МГДГ и ДГДГ в клетках *Chlorella* при длительном клиностаировании (продолжительность 30 сут), превышало показатели контрольного варианта (таблица), причем соотношение между общим содержанием галактолипидов и классами моно- и дигалактозилдиацилглицеридов в опытном и контрольном вариантах было в основном сходным (1 : 1,8 : 6,8 — в контроле; 1 : 2 : 7,0 — при клиностаировании).

Известно, что галактолипиды являются важными липидными компонентами фотосинтетических мембран хлоропластов высших растений [9] и клеток водорослей [10], причем с учетом динамических аспектов структуры мембраны стабильность ее двухфазного состояния зависит от состава и соотношения липидных компонентов, в том числе и МГДГ [11], и ДГДГ [12] как составляющих фотосинтетических мембран.

Сохранение соотношения между общим содержанием галактолипидов и отдельными их классами в клетках *Chlorella*, отмеченное в контрольном варианте и при клиностаировании, вероятно, направлено на поддержание структурной и функциональной целостности мембран при изменении внешних факторов. Так, было показано, что как количество, так и

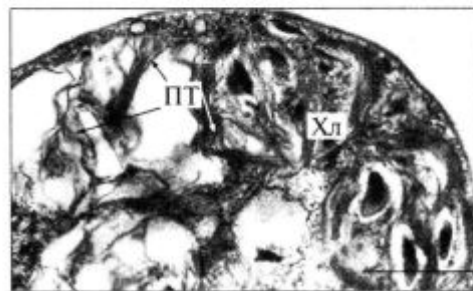


Рис. 2. Фрагмент клетки *Chlorella* с хлоропластом. Клиностаирование, 30 сут. Масштаб 1 мкм

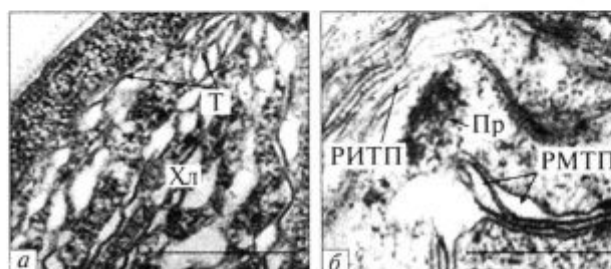


Рис. 3. Фрагменты хлоропластов клетки *Chlorella* (а, б). Клиностаирование, 30 сут. Пр — пиреноид; Т — тилакоид; ПТ — пучки тилакоидов; РИТП — расширения интратилакоидного пространства; РМТП — расширения межтилакоидного пространства. Масштаб 0,5 мкм

соотношение МГДГ/ДГДГ в тилакоидных мембранах растений изменялось при неблагоприятных условиях [13], что ведет к дестабилизации фотосинтетических комплексов [12]. Полученные данные свидетельствуют о важной роли галактолипидов в организации и функционировании мембранных структур. Так, ДГДГ стабилизируют двухслойную конфигурацию мембраны [14], тогда как МГДГ является составляющей светособирающих и АТФ-синтетазного комплексов и способны формировать монослойные структуры [15]. О важности соотношения этих классов липидов и уникальной роли МГДГ в функционировании тилакоидных мембран свидетельствуют эксперименты, выполненные с мутантной формой *Arabidopsis*, дефектной по гену MGD1 синтеза МГДГ [16]. Была продемонстрирована четкая корреляция появления различных дефектов в ультраструктуре хлоропластов со снижением содержания хлорофилла при значительном уменьшении количества МГДГ в мутантных

Содержание галактолипидов в клетках *Chlorella* (клиностаирование, 30 сут)

Вариант	Общее количество ГЛ, % мг	% мг	
		МГДГ	ДГДГ
Контроль	21,7 ± 3,4	5,6 ± 2,1	3,2 ± 1,8
Клиностаирование	52,4 ± 4,1	15,6 ± 3,4	7,4 ± 2,3

растениях *Arabidopsis* [16]. Кроме структурных показателей, жирнокислотный и липидный состав мембран также влияет на их функциональные особенности. На изолированных тилакоидных мембранах была показана зависимость степени повреждения их после замораживания и флюоресцентных свойств фотосинтетического аппарата от липидного и жирнокислотного состава мембран [17].

Выявленные нами перестройки мембранной системы хлоропластов клеток *Chlorella* в условиях клиностатирования дают основание предполагать, что они могут быть результатом изменений в липидном составе мембран в этих условиях. Как было показано при изучении состава полярных липидов в растениях пшеницы, выросших в условиях космического полета [4], липиды, характерные для фотосинтетических мембран, в том числе и моно- и дигалактозилдиацилглицериды, в этих условиях синтезируются, хотя авторы не исследовали их количество [4]. При этом они выявили увеличение индекса ненасыщенности жирных кислот в клетках высших растений, растущих при микрогравитации [4]. Сходные результаты были получены в экспериментах с культурой *Chlorella* при выращивании ее в условиях микрогравитации [18], а также у растений гороха при клиностатировании [5]. Как известно, изменения в составе жирных кислот, в частности, ненасыщенных, приводят к трансформации структурных и функциональных свойств мембран. Липиды, являясь основной матрицей мембраны, определяют ее конфигурацию. Поэтому физические свойства молекулы МГДГ могут обуславливать структурные изменения тилакоидной мембраны, а именно появление изгибов тилакоидов. В частности, конусообразная форма молекулы МГДГ вследствие наличия в ее структуре маленькой головки галактозы и длинной цепочки жирных кислот [19] может препятствовать плотной линейной упаковке тилакоидной мембраны. Более высокое содержание МГДГ, обладающего способностью формировать монослойные структуры [13], очевидно, также может способствовать формированию изгибов тилакоидов и, соответственно, неравномерных их расширений.

Таким образом, выявленное увеличение количества галактолипидов, особенно количест-

ва МГДГ, дает основание предполагать, что это может быть одной из причин появления перестроек в структурной организации мембранной системы хлоропластов клеток *Chlorella* в условиях микрогравитации и клиностатирования.

SUMMARY. Research of chloroplast ultrastructure in *Chlorella* cells grown during long-term period under clinorotation has been carried out. Different changes of the chloroplast structure, concerning both the amount of starch grains and stroma electron density as well as membrane system have been revealed. Occurrence of more significant bends of the thylakoids compared to the control and more loose arrangement of the thylakoids in a bunch were noted. The most significant changes were observed in a membrane system, in particular, appearance of the non-uniform expansions of the inter- and intrathylakoid spaces in *Chlorella* chloroplasts. Taking into account the role of galactolipids as important components of the photosynthetic membranes, the content of general galactolipids, monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol in *Chlorella* cells was determined. It was assumed that statistically significant increase of the galactolipid content, especially of MDG, can probably be one of the reasons of membrane system reorganizations in *Chlorella* cells under altered gravity.

РЕЗЮМЕ. Проведено дослідження ультраструктури хлоропластів клітин *Chlorella*, які тривалий час вирощували в умовах повільного горизонтального кліностатування. Виявлено різні зміни структурної організації хлоропластів, що стосуються кількості і розміру зерен крохмалю, електронної щільності стромы, а також мембранної системи хлоропластів клітин. Відзначено появу більш значних у порівнянні з контрольним варіантом вигинів пучків тилакоїдів у стромі хлоропластів і їх більш пухке розташування в пучках, а також формування нерівномірних розширень між- і інтратилакоїдного простору. З урахуванням значущості галактоліпідів як важливих складових компонентів фотосинтетичних мембран визначений вміст як загальних галактоліпідів, так і моно- та дигалактозилдиацилглицеридів в клітинах *Chlorella*. Висловлено припущення, що статистично достовірне збільшення вмісту галактоліпідів, особливо МГДГ, може бути однією з причин ультраструктурних перебудов мембранної системи хлоропластів клітин *Chlorella* в умовах зміненої гравітації.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л. Водоросли // Грибы и водоросли — объекты космической биологии. — М.: Наука, 1991. — С. 156—228.

2. *Popova A.F.* Chloroplast ultrastructure in *Chlorella* cells in microgravity // Альгология — 1999. — **9**, № 1. — С. 13—18.
3. *Shunxing J., Hilaire E., Paulsen A.Q., Guikema J.A.* Ultrastructural observation of altered chloroplast morphology in space-grown *Brassica rapa* cotyledons // J. Gravit. Phys. — 1999. — **6(1)**. — P. 93—94.
4. *Румянцева В.Б., Мерзляк М.Н., Машинский А.Л., Нечитайло Г.С.* Влияние факторов космического полета на пигментный и липидный состав растений пшеницы // Косм. биология и аэрокосм. медицина. — 1990. — № 1. — С. 53—55.
5. *Бараненко В.В.* Пероксидне окиснення ліпідів та активність супероксиддисмутази в рослинах гороху за умов кліностагування : Дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2003. — 162 с.
6. *Purpo A., Herrada G., Rigaud J.* Lipid peroxidation in peribacteroid membranes from French-bean nodules // Plant Physiol. — 1991. — **96**. — P. 826—830.
7. *Dormann P.* Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the *Arabidopsis* *dgd1* mutant // Plant Physiol. — 2002. — **128(3)**. — P. 885—895.
8. *Svennerholm L.* The quantities estimation of cerebrosydes in Nervous tissue // J. Neurochemistry. — 1956. — **1**, № 1. — P. 42—53.
9. *Jacob J.S., Miller K.R.* The effects of galactolipid depletion on the structure of a photosynthetic membrane // J. Cell Biol. — 1986. — **103**. — P. 13—47.
10. *Riekhof W. R., Sears B. B., Benning C.* Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr // Eukaryot Cell. — 2005. — **4(2)**. — С. 242—252.
11. *Benning C., Ohta H.* Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants // J. Biol Chem. — 2005. — **280**. — P. 2397—4000.
12. *Klaus D., Hartel H., Fitzpatrick L.M. et al.* Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the *Arabidopsis* *dgd1* mutant // Plant Physiol. — 2002. — **128(3)**. — P. 885—895.
13. *Светлова Н.Б.* Ліпід-пигментний комплекс та екзогенні біорегулятори у формуванні адаптивних реакцій пшениці до посухи : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2000. — 20 с.
14. *Quinn P.J., Willams W.P.* The structural role of lipids in photosynthetic membranes // Biochem. Biophys. Acta. — 1983. — **737(2)**. — P. 223—266.
15. *Uemura M., Steponkus P.L.* Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane // J. Plant Res. — 1999. — **112**. — P. 245—354.
16. *Jarvis P., Dormann P., Peto C.A. et al.* Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — **97**, № 14. — P. 8175—8179.
17. *Popova A.V., Velitchkova M.Y.* Effect of membrane lipid order on the degree of freezing damage of thylakoid membranes // Cryoletters. — 2004. — **25**, № 4. — P. 255—264.
18. *Антоян А.А., Мелешко Г.Й., Левинских М.А. и др.* Метаболизм одноклеточных водорослей в космическом полете // Результаты исследований на биоспутниках. — М.: Наука, 1992. — С. 387—391.
19. *Webb M.S., Green B.R.* Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids // Biochem. Biophys. Acta.— 1991. — **1060(1)**. — P. 133—158.

Поступила 18.07.05