

УДК 581.1

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХЛОРОПЛАСТОВ РАСТЕНИЙ-ГАЛОФИТОВ

© 2019 г. П. Ю. Воронин^{а, *}, Л. А. Иванова^б, Д. А. Ронжина^б, Н. А. Мясоедов^а, Ю. В. Балнокин^{а, с}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: pavel@ippras.ru

Поступила в редакцию 04.05.2018 г.

После доработки 09.10.2018 г.

Принята к публикации 30.11.2018 г.

Морфометрически охарактеризованы хлоропласты двух различающихся по солеустойчивости групп галофитов: “высоко солеустойчивых” (*Climacoptera aralocaspica* L., *Salicornia europaea* L., *Suaeda arcuata* (Vange) L.) и “умеренно солеустойчивых” (*Kochia prostrata* (Shrad.) L. и *K. scoparia* L.). Растения первой и второй групп выращивали в течение 2.5 месяцев при почвенном засолении в диапазонах 0–1000 и 0–600 ммоль/дм³ Na⁺, соответственно. Морфометрические параметры (линейные размеры, доля стромальных включений крахмала и пластоглобул) хлоропластов мезофилла двух групп поддерживались на постоянном уровне в соответствующих диапазонах почвенного засоления, практически совпадающих с диапазонами их стабильной фотосинтетической активности. Предполагается, что хлоропласты, обеспечивая энергией и ассимилятами процессы ионного и водного гомеостатирования, реализуемые на клеточном и надклеточном уровнях в пределах нормы реакции организма, вносят вклад в формирование системного ответа растения на почвенное засоление.

Ключевые слова: *Climacoptera aralocaspica* – *Salicornia europaea* – *Suaeda arcuata* – *Kochia prostrata* – *Kochia scoparia* – засоление почвы – хлоропласт – морфометрия – норма реакции на стресс

DOI: 10.1134/S0015330319050208

ВВЕДЕНИЕ

Галофиты – растения, обитающие на почвах с высоким содержанием солей натрия, в процессе эволюции сформировали механизмы, эффективно поддерживающие (1) концентрации Na⁺ и Cl⁻ в цитоплазме на более низком уровне, чем в почвенном растворе и (2) снижающие водный потенциал в клетках до более низких значений, чем в почве. Механизмы первого типа избавляют биополимеры от токсического действия ионов [1–4], второго – обеспечивают в условиях засоления водоснабжение клеток [2–6]. Затрачивая энергию, клетки выводят поглощенные ионы Na⁺ назад в экстраклеточное пространство и осуществляют их компартментацию в вакуолях [1, 4, 5]. Благодаря накоплению ионов, в вакуолях снижается водный потенциал клетки. В цитоплазме водный потенциал снижается за счет биосинтеза осмолитов – низкомолекулярных органических соединений, обладающих по отношению к цитоплазматическим биополимерам еще и протекторным действием [7]. Стратегия поддержания ионного и водного го-

меостаза у растений проявляется не только на клеточном, но и на тканевом и организменном уровнях. Избыток Na⁺ и Cl⁻ может быть депонирован в специализированных тканях и старых листьях [4, 5, 8], или выведен наружу через солевые железки [9], что снижает содержание этих ионов в молодых, активно метаболизирующих тканях. Примером механизма Na⁺-гомеостатирования, проявляющегося на уровне целого растения, является ксилемная разгрузка Na⁺, происходящая в базальной части корня и в местах прикрепления листьев к стеблю [10]. Благодаря такой разгрузке содержание Na⁺ снижается в листовой пластинке, что вносит вклад в защиту хлоропластов и процесса фотосинтеза от избытка этого иона. В стратегии выживания растений в условиях длительного почвенного засоления важную роль, по видимому, играет размер депо для ионов Na⁺, Cl⁻ и воды. В соответствии с этим, проведенные нами ранее на C₃- и C₄-галофитах исследования показали, что чувствительность фотосинтетической функции к почвенному засолению тем ниже, чем

выше степень суккулентности листьев. При засолении изменяется соотношение между фототрофными и водоносными тканями в пользу последних [11], а вакуоли клеток ассимилирующих тканей увеличиваются в объеме [12].

Как было показано А.Т. Мокроносовым с сотрудниками [13, с. 48–52], ряд морфометрических параметров хлоропластов коррелирует друг с другом, а также со скоростью фотосинтеза. В частности, положительная корреляция была установлена между содержанием хлорофилла в листе (мг/дм^2) и его содержанием в единичном хлоропласте, а также с числом хлоропластов, рассчитанным на единицу площади листа. Скорость фотосинтеза ($\text{мг CO}_2/(\text{дм}^2 \text{ час})$) обнаружила положительную корреляцию с содержанием хлорофилла в единичном хлоропласте, числом хлоропластов на единицу площади листа и индексом поверхности хлоропласта. По данным Цельникер [14], скорость фотосинтеза находится в положительных коррелятивных отношениях с такими параметрами мезоструктуры листа как сухая масса, рассчитанная на единицу поверхности листа, число хлоропластов на единицу поверхности, суммарная поверхность хлоропластов, внутренняя поверхность листа и толщина листа. Растения одного и того же вида (сорта) и одного возраста, выращенные в одинаковых условиях, характеризуются приблизительно одинаковыми морфометрическими параметрами хлоропластов и мезоструктуры фотосинтетических тканей, а также одинаковыми скоростями фотосинтеза и одинаковой активностью фотосинтетических ферментов. В стрессовых условиях происходят нарушения фотосинтетической функции, которые сопровождаются изменениями морфометрических параметров хлоропластов и структуры фотосинтетических тканей. Формирование фотосинтетического аппарата с одной стороны обнаруживает стабильность и четкое проявление генотипа, с другой стороны – специфически реагирует на экологические факторы [13, с. 84–92]. Следует отметить, что изменение функции и структуры хлоропластов в ответ на действие стрессового фактора может отражать как активирование защитных процессов, так и быть следствием вызванных этим фактором повреждений.

Исходя из вышесказанного предположили, что морфометрические параметры фотосинтетического аппарата и мезоструктуры листа могут быть использованы для оценки амплитуды напряженности того или иного стрессового фактора, в которой растение поддерживает гомеостаз в условиях действия данного фактора и отвечает на стрессовое воздействие в пределах нормы реакции организма. Задача настоящей работы состояла в изучении реакции фотосинтетического аппарата растений галофитов на засоление путем измере-

ния морфометрических параметров хлоропластов галофитов, выращенных при разных уровнях почвенного засоления и обладающих разной устойчивостью к засолению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили электронно-микроскопические образцы хлоропластов листьев различающихся по солеустойчивости галофитов. *Climacoptera aralocaspica* L. (климакоптера аралокаспийская), *Salicornia europaea* L. (солерос европейский) и *Suaeda arcuata* (Bange) L. (сведа дуголистная) представляют собой высоко солеустойчивые галофиты, тогда как *Kochia prostrata* (Shrad.) L. (кохия распростертая) и *Kochia scoparia* L. (кохия веничная) являются относительно менее устойчивыми к засолению галофитами [11].

Растительный материал был получен в описанной ранее экспериментальной модели почвенного солевого стресса [11]. Растения выращивали в течение 2.5 месяцев (апрель–июнь) в оранжерее на свету (12 клк) с дополнительной подсветкой ртутными лампами высокого давления ДРЛ-1000 (СССР). Общая освещенность составляла 25–30 клк. Растения выращивали в сосудах, содержащих 4.5 кг серо-подзолистой почвенно-песчаной смеси (3 : 1 v/v) (далее почва). Через месяц после прорастания растения прореживали до плотности посадки 5 растений на сосуд. Температурный режим – 25/18°C (день/ночь). Растения поливали смесью солей NaCl и Na₂SO₄ (весовое отношение 2 : 1) порциями (50 ммоль Na⁺ на дм³ почвы с расчетом достижения конечной концентрации Na⁺, указанной в тексте, в таблицах и на рисунках. Контрольные растения поливали водопроводной водой.

Для электронно-микроскопических исследований образцы ткани листа подготавливали в соответствии со стандартной методикой [11]. Для каждого варианта засоления каждого вида исследовали 3–5 растений. Для этого в первой половине дня (с 10 до 12 часов) отбирали листья среднего яруса, фрагменты из средней части листовой пластины фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом с последующей дофиксацией 1% OsO₄ и заключением в эпоксидную смолу Эпон-812 после обезвоживания в растворах спиртов и ацетоне. Поперечные и продольные ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-4801 (“LKB”, Швеция). Срезы контрастировали в растворах уранилацетата и цитрата свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (“Jeol”, Япония). Анализировали не менее 3 микрофотографий с каждого листа, так что общее число повторностей для измерения размеров хлоропластов и численной плотности включений было не менее 15 для каждого варианта вида. Объем и структурные па-

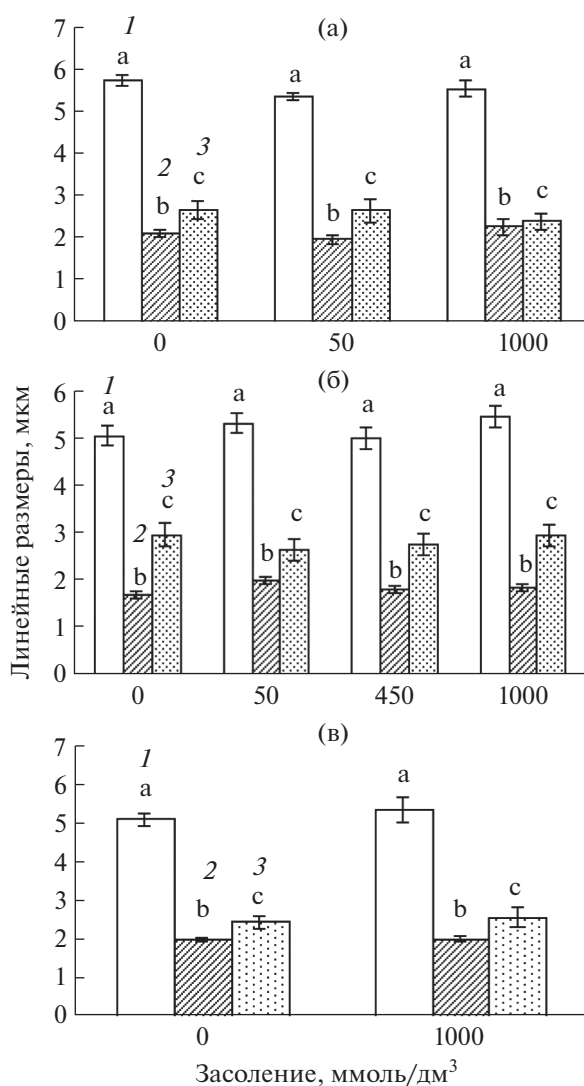


Рис. 1. Морфометрические параметры хлоропластов листьев группы высоко солеустойчивых галофитов — *Climacoptera aralocaspica* L. (а), *Salicornia europea* L. (б), *Suaeda arcuata* (Vange.) L. (в), выращенных при разных уровнях засоления почвы. 1 — длина большой оси хлоропласта, 2 — длина малой оси хлоропласта, 3 — отношение длины большой оси к малой оси хлоропласта. Достоверные отличия количественных показателей отмечены разными латинскими буквами.

параметры хлоропластов определяли с использованием проекционного метода [15] и с применением автоматизированной системы анализа изображений Siams Mesoplant (SIAMS, Екатеринбург, Россия) [16]. Линейные размеры пластоглобул измеряли в количестве повторностей от 50 до 100 на каждый вариант для данного вида. Доли включений крахмала и пластоглобул определяли по отношению площади включений к площади стромы хлоропласта. Значимость различий между вариантами оценивали с помощью Тьюки HSD-теста в программе Statistica 6.0. В таблицах и на

рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее для высоко солеустойчивых галофитов *C. aralocaspica*, *S. europea* и *S. arcuata* была продемонстрирована ассимиляционная активность вплоть до уровня почвенного засоления в 1000 ммоль/дм³ Na⁺. В случае же умеренных галофитов *K. prostrata* и *K. scoparia* предел фотосинтетической активности соответствовал засолению почвы в 600 ммоль/дм³. При этом в обеих группах галофитов с ростом уровня засоления наблюдалось усиление признака суккулентности [11]. Такой ответ на засоление предполагал, что вплоть до указанных концентрационных пределов солей все исследовавшиеся растения-галофиты остаются способными поддерживать ионный и водный гомеостаз цитоплазмы и, соответственно, создавать благоприятные условия для функционирования хлоропластов. Вместе с тем, наличие механизмов ионного и водного гомеостатирования, проявляющихся на клеточном и надклеточном уровнях, не исключает участия самих хлоропластов в ответе растений на почвенное засоление [17, с. 277]. Более того, активирование этих механизмов в стрессовых условиях предполагает повышенный запрос на продукты фотосинтеза, в частности АТФ и ассимиляты. Если же концентрации ионов в почве выходят за пределы нормы реакции растения, то изменения в структуре и в функциях хлоропластов должны отражать также повреждающие эффекты солей.

В качестве показателей структурной и функциональной перестройки хлоропластов, вызванной засолением, были выбраны изменения линейных размеров хлоропластов (длин большой и малой осей) [18, 19], а также размеров, числа и плотности крахмальных гранул и пластоглобул в строме. Изменение доли объема стромального компартмента, занятого крахмальными гранулами, можно рассматривать как показатель изменения соотношения биосинтетической и экспортной функций хлоропластов, т.е. соотношения между скоростями фотосинтеза и потребления ассимилятов (source/sink) [13, с. 143–146]. Накопление пластоглобул в строме отражает процесс деградации фотосинтетических мембран. Доля объема стромального компартмента, занятого пластоглобулами, может служить маркером индивидуального возраста хлоропласта и степени его старения [20]. Потенциальное увеличение этой доли может свидетельствовать об усилении индуцированного стрессом старения хлоропластов и, как следствие, о частичной или полной утрате ими функции.

Ранее было показано, что выращивание высоко солеустойчивых галофитов *C. aralocaspica*, *S. europaea* и *S. arcuata* в условиях почвенного засоления вплоть до 1000 ммоль/дм³ Na⁺ не приводит к полному подавлению фотосинтетической функции. У всех высоко солеустойчивых видов было отмечено постоянство содержания хлорофилла в листьях [11]. В данном исследовании не было обнаружено статистически достоверных различий в размерах большой и малой осей хлоропластов, а также в их соотношении во всем диапазоне засоления от 0 до 1000 ммоль/дм³ (рис. 1). Для умеренно солеустойчивых галофитов *K. prostrata* и *K. scoparia* ранее было показано, что более чем 20% от максимальных значений снижение фотосинтеза и содержания хлорофилла (*a + b*) происходит только, начиная с 400 ммоль/дм³ Na⁺. При этом соотношение хлорофиллов *a* и *b* остается таким же, как в контроле [11]. Результаты морфометрических измерений, выполненные нами, показывают, что умеренные галофиты сохраняют постоянство размеров хлоропластов во всем диапазоне засоления вплоть до 600 ммоль/дм³ (рис. 2).

Для большинства обследованных галофитов, как предельно, так и умеренно устойчивых к засолению, крахмальные включения занимали относительно небольшую (около 3–5%) долю площади стромального компартмента при разных уровнях почвенного засоления (табл. 1). Такое относительно небольшое содержание крахмальных включений в строме может указывать на стабильное отношение потоков (синтез + реассимиляция)/экспорт продуктов фотосинтеза. Аналогичный результат (4–9%) получен и в отношении доли стромального компартмента, занятого пластогло-

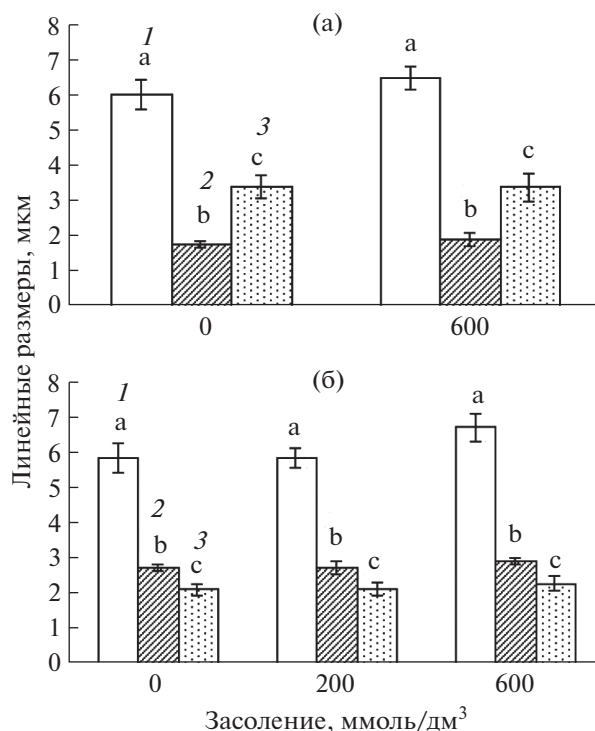


Рис. 2. Морфометрические параметры хлоропластов листьев растений умеренных галофитов – *Kochia prostrata* (Schrad.) L. (а), *Kochia scoparia* L. (б). 1 – длина большой оси хлоропласта, 2 – длина малой оси хлоропласта, 3 – отношение длины большой оси к малой оси хлоропласта. Достоверные отличия количественных показателей отмечены разными латинскими буквами.

булами (табл. 2). Этот результат свидетельствует в пользу постоянства среднего индивидуального возраста хлоропластов в клетках мезофилла ли-

Таблица 1. Крахмальные включения в строме хлоропласта

Вид*	Засоление почвы, ммоль/дм ³	Плотность, шт./мкм ²	Длина, мкм	Ширина, мкм	Доля от стромы, %
<i>Climacoptera aralocaspica</i> L.	Контроль	0.07 ± 0.02 ^b	1.4 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.1 ^a	5 ^a
	50	0.04 ± 0.02 ^b	1.3 ± 0.2 ^{ab}	0.7 ± 0.1 ^a	3 ^a
	1000	0.20 ± 0.10 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.04 ^a	2 ^a
<i>Salicornia europaea</i> L.	Контроль	0.04 ± 0.02 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.1 ^a	2 ^a
	50	0.08 ± 0.03 ^{ab}	0.9 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.04 ^a	3 ^a
	500	0.08 ± 0.03 ^{ab}	0.6 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.04 ^a	2 ^a
<i>Suaeda arcuata</i> (Bange.) L.	Контроль	0.10 ± 0.03 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.04 ^a	4 ^a
	1000	0.15 ± 0.04 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	6 ^a
	1000	0.12 ± 0.02 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^a	4 ^a
<i>Kochia scoparia</i> L.	Контроль	0.14 ± 0.03 ^a	1.7 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	5 ^a
	200	0.12 ± 0.03 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	0.6 ± 0.1 ^a	5 ^a
	600	0.06 ± 0.02 ^a	1.1 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	3 ^a

Примечание. * На электронно-микроскопических изображениях хлоропластов *Kochia prostrata* (Schrad.) L. крахмальных включений обнаружено не было. Латинскими буквами обозначена значимость различий между вариантами засоления внутри вида – одинаковые буквы означают отсутствие значимых различий.

Таблица 2. Включения пластоглобул в строме хлоропласта

Вид	Засоление почвы, ммоль/дм ³	Плотность, шт./мкм ²	Диаметр, мкм	Доля от стромы, %
<i>Climacoptera aralocaspica</i> L.	Контроль	0.74 ± 0.11a	0.26 ± 0.01ab	5a
	50	1.04 ± 0.11a	0.17 ± 0.01b	4a
	1000	0.79 ± 0.10a	0.32 ± 0.01a	6a
<i>Salicornia europea</i> L.	Контроль	0.37 ± 0.12a	0.19 ± 0.01b	3a
	500	0.34 ± 0.08a	0.24 ± 0.01ab	4a
	1000	0.36 ± 0.07a	0.31 ± 0.01a	3a
<i>Suaeda arcuata</i> (Bange.) L.	Контроль	1.29 ± 0.18a	0.17 ± 0.01a	4a
	1000	1.1 ± 0.20a	0.22 ± 0.01a	5a
<i>Kochia prostrata</i> (Schrad.) L.	Контроль	4.66 ± 0.66a	0.14 ± 0.01b	9a
	600	2.3 ± 0.45a	0.20 ± 0.01a	9a
<i>Kochia scoparia</i> L.	Контроль	1.79 ± 0.36a	0.19 ± 0.01a	9a
	200	1.56 ± 0.24a	0.23 ± 0.01a	9a
	600	1.44 ± 0.15a	0.23 ± 0.01a	8a

Примечание. Латинскими буквами обозначена значимость различий между вариантами засоления внутри вида – одинаковые буквы означают отсутствие значимых различий.

ствьев [20], при уровне почвенного засоления в пределах физиологической нормы реакции растения на стресс.

Таким образом, полученные данные показывают, что морфометрические параметры хлоропластов мезофилла листьев двух различающихся по устойчивости групп галофитов сохраняются и поддерживаются на постоянном уровне практически во всем диапазоне поддержания функциональной активности фотосинтеза листа. В этом диапазоне растения-галофиты демонстрируют ответ в пределах нормы реакции организма и не обнаруживают повреждающих эффектов засоления на хлоропласт. Это означает, что, обеспечивая энергией и ассимилятами процессы ионного и водного гомеостатирования, реализуемые на клеточном и надклеточном уровнях, хлоропласты на субклеточном уровне вносят свой вклад в устойчивость растений-галофитов к почвенному засолению.

Исследования Ивановой Л.А. и Ронжиной Д.А. выполнены в рамках проекта № АААА-А17-117072810011-1, поддержанного Российским федеральным бюджетом.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 735–742.
2. Yeo A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology // *J. Exp. Bot.* 1998. V. 49. P. 915–929.
3. Glenn L.P., Brown J.J., Blumwald E. Salt tolerance and crop potential of halophytes // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1999. V. 18. P. 227–255.
4. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. Plant cellular and molecular responses to high salinity // *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Molec. Biol.* 2000. V. 51. P. 463–499.
5. Greenway H., Munns R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1980. V. 31. P. 149–190.
6. Teakle N., Tyerman S.D. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance // *Plant, Cell and Environment.* 2010. V. 33. P. 566–589.
7. Briens M., Larher F. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betains and free proline // *Plant, Cell and Environ.* 1982. V. 5. P. 287–292.
8. Adams P., Thomas J.C., Vernon D.M., Bohnert H.J., Jensen R.G. Distinct cellular and organismic responses to salt stress // *Plant cell Physiol.* 1992. V. 33. P. 1215–1223.
9. Yuan F., Leng B., Wang B. Progress in studying salt secretion from the salt glands in recretahalophytes: How do plants secrete salt? // *Frontiers in Plant Sciences.* 2016. V. 7. Article 977.
10. Horie T., Hauser F., Schroeder J.L. NKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 660–668.
11. Воронин П.Ю., Манжулин А.В., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В., Терентьева Е.И. Морфологический тип и фотосинтетическая функция листьев С₄-растений при длительном засолении почвы // *Физиология растений.* 1995. Т. 42. С. 356–367.

12. Орлова Ю.В., Мясоедов Н.А., Кириченко Е.Б., Балнокин Ю.В. Вклад неорганических ионов, растворимых углеводов и многоатомных спиртов в поддержание водного гомеостаза у *Artemisia lerchiana* (Web.) и *Artemisia pauciflora* (Web.) в условиях засоления // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 220–231.
13. Мокроносов А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука. 1981. 196 с.
14. Цельникер Ю.Л. Репликация хлоропластов, ее регуляция и значение для фотосинтеза // Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата / А.Т. Мокроносов (отв. ред.) – Свердловск: УрГУ, 1978. С. 31–45.
15. Иванова Л.А., Петров М.С., Кадушников Р.М. Определение диффузионного сопротивления мезофилла *Chamaerion angustifolium* методом трехмерной реконструкции клеточной упаковки листа // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 354–365.
16. Иванова Л.А., Пьянков В.И. Структурная адаптация мезофилла листа к затенению // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 467–480.
17. Lambers H., Chapin III F.S., Pons Th.L. Plant Physiological Ecology. N.Y., Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 1998. 540 с.
18. Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Ivanov L.A., Stroukova L.V., Peuke A.D., Rennenberg H. Chloroplast parameters differ in wild type and transgenic poplars overexpressing gsh1 in the cytosol // Plant Biology. 2009. V. 11. № 4. P. 625–630.
19. Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Ivanov L.A., Stroukova L.V., Peuke A.D., Rennenberg H. Over-expression of gsh1 in the cytosol affects the photosynthetic apparatus and improves the performance of transgenic poplars on heavy metal-contaminated soil // Plant Biology. 2011. V. 13. № 4. P. 649–659.
20. Гамалей Ю.В. Продолжительность жизни хлоропластов в клетках мезофилла листопадных и вечнозеленых растений // Цитология. 1975. Т. 17. С. 1243–1250.