# \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

УДК 581.1

# ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ *Cucumis sativus* L. И *Secale cereale* L. ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ЗАКАЛИВАНИИ

# © 2021 г. В. Н. Попов<sup>а, \*</sup>, Н. В. Астахова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

> \**e-mail: vnpopov@mail.ru* Поступила в редакцию 23.09.2020 г. После доработки 17.12.2020 г. Принята к публикации 17.12.2020 г.

Исследовали изменение ультраструктуры хлоропластов у теплолюбивых (огурец обыкновенный, Cucumis sativus L.) и морозостойких (рожь посевная озимая. Secale cereale L.) растений при низкотемпературном закаливании. Установлено, что в результате закаливания у обоих видов происходило снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте на 20–30%. Это достигалось за счет снижения длины мембран гранальных и стромальных тилакоидов у огурца, а также за счет снижения длины мембран гранальных тилакоидов при сохранении длины мембран тилакоидов стромы у озимой ржи. При этом у растений огурца происходило уменьшение площади хлоропласта и увеличение площади крахмального зерна более чем в 3 раза. У озимой ржи после закаливания площадь хлоропласта увеличивалась, а крахмальные зерна полностью отсутствовали. S. cereale и C. sativus coхраняли фотосинтез при закаливающих температурах, хотя его интенсивность снижалась в 2–3 раза по сравнению с контролем. У обоих видов увеличивалось содержание растворимых сахаров в листьях: у огурца – на 20%, а у озимой ржи – более чем в 3 раза. Сделан вывод о том, что накопление крахмала в хлоропластах огурца свидетельствовало о выведении значительной части продуктов фотосинтеза из осмотического пула, что ограничивало эффективность закаливания C. sativus. Растения озимой ржи за счет реорганизации тилакоидной системы, а также благодаря отсутствию синтеза крахмала в хлоропластах, кратно увеличивали содержание растворимых сахаров в клетках, что обеспечивало высокую эффективность низкотемпературного закаливания этих растений.

**Ключевые слова:** *Сиситіs sativus, Secale cereale*, ультраструктура хлоропластов, фотосинтез, сахара, низкотемпературное закаливание

DOI: 10.31857/S0015330321040138

#### введение

Низкотемпературное закаливание растений рассматривается как процесс формирования свойств холодо- и морозостойкости растений в соответствующих генотипу условиях и всегда сопровождается перестройкой ультраструктуры клеток и хлоропластов [1]. Изменения в ультраструктурной организации хлоропластов имеют особое значение, поскольку считается, что они направлены на сохранение фотосинтеза и обеспечение растений ассимилятами при низких температурах, что является необходимым условием приобретения устойчивости к холоду [2].

В литературе имеются многочисленные и довольно противоречивые сведения, касающиеся изменения ультраструктуры хлоропластов в условиях низких температур. Наиболее характерные особенности реорганизации хлоропластов при низкотемпературном закаливании можно разделить на три группы. К первой относятся изменения размеров и формы хлоропластов, ко второй изменения мембранной системы хлоропластов, а к третьей группе — изменения числа и размеров пластоглобул и крахмальных зерен [3]. Ряд авторов наблюдали увеличение площади хлоропластов у теплолюбивых растений огурца [4] и фасоли [5], холодостойких растений картофеля [6] и у морозостойкой озимой пшеницы [7].

Изменения структуры мембранной системы хлоропластов в условиях низких температур описаны для разных видов растений. Так, у теплолюбивых растений табака за время низкотемпературного закаливания происходило снижение числа гран в хлоропласте одновременно с уменьшением площади

Сокращения: ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ФС I – фотосистема I; ФС II – фотосистема II.

одной граны, что приводило к 30% снижению суммарной площади гран в хлоропластах [8]. Хлоропласты растений ячменя в условиях закаливающей температуры демонстрировали уменьшение числа тилакоидов в гране, причем расположение тилакоидов становилось более плотным, с заметным уменьшением пространства между ними [9]. У растений морозостойкой озимой пшеницы наблюдали уменьшение площади гран в хлоропластах и снижение количества тилакоидов в гране при закаливании [10]. Как правило, такие изменения в мембранной системе растений трактуются с точки зрения защиты от фотоингибирования ФС II, компоненты которой в основном локализованы в тилакоидах граны [11].

Пластоглобулы, по современным представлениям, рассматриваются как липопротеидные частицы, включающие белки, триацилглицерины, токоферолы, а также свободные жирные кислоты [12]. Пластоглобулы в хлоропластах служат для накопления резервных высокоэнергетических метаболитов, участвуют в формировании тилакоидных мембран, регуляции фотосинтеза и метаболизме жасмоновой кислоты [12]. Как правило, при закаливании происходит увеличение площади и числа пластоглобул у морозостойких растений, таких как озимая пшеница и рожь [13]. У теплолюбивых растений наблюдали как увеличение числа пластоглобул (у фасоли [14]), так и полное их отсутствие (у томата и огурца [15]).

Площадь и количество крахмальных зерен в хлоропластах очень динамично изменяются в ответ на действие холода. Даже у одного вида растений (*Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) одни исследователи наблюдали гидролиз крахмальных зерен в хлоропластах [16], а другие фиксировали накопление крахмала в хлоропластах при закаливании [17].

Таким образом, представленные в литературе противоречивые данные не позволяют сделать однозначный вывод о роли изменений ультраструктуры хлоропластов в низкотемпературном закаливании теплолюбивых и морозостойких растений. Результаты экспериментов сильно варьируют в зависимости от видовой специфики, возраста растений и режимов низкотемпературного закаливания. В связи с этим, целью нашей работы было сравнительное исследование изменений ультраструктуры хлоропластов двух контрастных по отношению к температуре видов растений: экстремально теплолюбивого огурца и морозостойкой озимой ржи в связи с их способностью осуществлять фотосинтез в условиях кратковременного (5 сут) низкотемпературного закаливания. У обоих видов растений, наряду с ультраструктурной организацией хлоропластов, изучали холодоустойчивость, СО2-газообмен и изменения в накоплении растворимых сахаров в результате низкотемпературного закаливания.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектами исследования являлись теплолюбивые растения огурца обыкновенного (Cucumis sativus L., сорт Конкурент) и морозостойкие растения ржи посевной озимой (Secale cereale L., сорт Пурга). Растения выращивали в вазонах с почвой объемом 250 мл в камерах фитотрона ИФР РАН при температуре 22°С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Возраст растений в начале экспериментов составлял 4 недели. Закаливание растений проводили в течение 5 сут в климатической камере KBW-240 ("Binder", Германия) при следующих условиях: огурец - температура +12°C, 16-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), озимая рожь – температура +2°С, 16-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м<sup>2</sup>с). Данные режимы закаливания были подобраны в ходе предварительных опытов. Контрольные растения оставляли при температуре 22°С в камерах фитотрона ИФР РАН.

Устойчивость растений к гипотермии. Для оценки устойчивости C. sativus и S. cereale к низким температурам незакаленные и закаленные растения обоих видов тестировали в климатической камере MIR-153 ("Sanyo", Япония) в ходе трех от-дельных экспериментов: 3°С 1 сут, 0°С 1 сут, – 3°С 1 сут для огурца и -3°С 1 сут, -6°С 1 сут, -9°С 1 сут для озимой ржи. Степень устойчивости незакаленных и закаленных растений оценивали по выходу электролитов (в %) из листовой ткани в водную фазу. Для этого электропроводность водных экстрактов определяли при помощи кондуктометра SG7-ELK ("Mettler Toledo", Швейцария). Выход электролитов из тканей листьев (V, в %) рассчитывали по формуле:  $V = 100 \times (L_0/L_k)$ , где  $L_0 - L_0$ электропроводность исследуемого образца до или после холодовой экспозиции и  $L_k$  – электропроводность того же образца после кипячения [18].

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры хлоропластов. Для получения препаратов для микроскопии использовали фрагменты из срединной части четвертого листа C. sativus и S. cereale. Фрагменты листьев незакаленных и закаленных растений отбирали в середине светового дня и фиксировали в течение четырех часов 2.5% глутаровым альдегидом в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) при температуре 4°С. После 4-кратной промывки фосфатным буфером материал фиксировали 1% водным раствором OsO<sub>4</sub>, обезвоживали последовательно растворами этанола в возрастающих концентрациях и ацетоном, а затем заливали в Ероп-812. Ультратонкие срезы листьев растений получали на ультрамикротоме LKB3 ("LKB", Швеция). Срезы просматривали при помощи электронного микроскопа LIBRA120 ("ZEISS", Германия) сначала при увеличении ×400 для отбора клеток столбчатого мезофилла



**Рис. 1.** Выход электролитов (%) из клеток листьев незакаленных и закаленных растений огурца, подвергнутых охлаждению и промораживанию (1 - до охлаждения при температуре 3°C в течение 1 сут, 3 - после охлаждения при температуре 0°C в течение 1 сут, 4 - после промораживания при температуре  $-3^{\circ}$ C в течение 1 сут). Достоверные различия средних значений при P < 0.05 отмечены разными латинскими буквами над барами.

листьев огурца и первого субэпидермального слоя мезофилла листьев озимой ржи, а затем в отобранных клетках просматривали хлоропласты при увеличении ×4000. Морфометрию хлоропластов проводили при помощи встроенного программного обеспечения электронного микроскопа LIBRA120 ("ZEISS", Германия), при этом просматривали не менее 150 хлоропластов каждого варианта [19]. Измеряли плошаль среза хлоропласта. граны, крахмального зерна, пластоглобулы, а также число гран, крахмальных зерен и пластоглобул на срезе хлоропласта. Суммарную длину мембран тилакоидов в хлоропласте определяли путем сложения длин мембран гранальных и стромальных тилакоидов. Коэффициент гранальности хлоропластов рассчитывали как отношение длины мембран гранальных тилакоидов к длине мембран тилакоидов, имеющих контакт со стромой.

СО<sub>2</sub>-газообмен растений. Измерение CO<sub>2</sub>-газообмена растений *C. sativus* и *S. cereale* проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Германия) при интенсивности освещения 500 мкмоль/( $M^2$  с) для огурца и 800 мкмоль/( $M^2$  с) для озимой ржи. Содержание CO<sub>2</sub> в продуваемом через листовую камеру воздухе составляло 380 ppm. Измерения проводили у контрольных растений огурца и озимой ржи (при температуре 22°C) и у растений после процедуры низкотемпературного закаливания (при температурах 12°C для огурца и 2°C для озимой ржи), т.е.

при температурах, идентичных температурам вегетации и холодового закаливания. Длительность единичного измерения составляла не менее 20 мин на свету после достижения постоянной скорости ассимиляции CO<sub>2</sub> и 20 мин после выключения света. Определение сухой массы листьев проводили путем их высушивания при температуре  $80^{\circ}$ C до постоянного веса. Измерения газообмена включали определение скорости видимой ассимиляции CO<sub>2</sub> и темнового дыхания, которые выражали в мг CO<sub>2</sub>/(г сухой массы ч). На основе этих параметров рассчитывали отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание [20].

Определение содержания сахаров. Навески листьев и корней *C. sativus* и *S. cereale* (~500 мг) отбирали в середине светового дня и фиксировали 96% кипящим этанолом. Ткань растирали в фарфоровой ступке и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80% этанолом. В полученных экстрактах определяли содержание глюкозы — глюкозооксидазным методом, сахарозы и фруктозы по методу Рое. Полученные результаты выражали в мг/г сухой массы [21].

Во всех экспериментах биологическая повторность измерений была 6-кратной, аналитическая — 3-4-кратной. Каждый эксперимент повторяли не менее 3-4 раз. При морфометрических исследованиях обработку полученных результатов проводили на основании данных по 150 хлоропластам каждого варианта. Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На гистограммах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями оценена по *t*-критерию Стьюдента для 95% уровня значимости (P < 0.05). Достоверно различающиеся между собой величины обозначены разными надстрочными буквами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

# Устойчивость растений C. sativus и S. cereale к гипотермии

Данные по выходу электролитов из листьев исследуемых растений представлены на рисунках 1 и 2. Выход электролитов у растений огурца при температурах вегетации (22°С) и закаливания (12°С) находился на уровне 9 – 10%. Незакаленные растения огурца демонстрировали 5-кратный рост выхода электролитов (до 50%) уже после обработки низкой положительной температурой 3°С в течение 1 сут. При температурах 0 и -3°С выход электролитов достигал 87–92%, и все незакаленные растения погибали. Растения огурца, прошедшие процедуру низкотемпературного закаливания, сохраняли свою жизнеспособность после действия температур 3 и 0°С (выход электролитов 18 и 40%, соответственно), и погибали

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 68 № 4 2021

только после применения отрицательной температуры  $-3^{\circ}$ C, когда выход электролитов достигал 90%.

Величина выхода электролитов у озимой ржи при температурах вегетации (22°С) и закаливания (2°С) составляла 6–7%. У незакаленных растений озимой ржи после промораживания при температуре –3°С значение выхода электролитов возрастало лишь до 15%, существенный уровень повреждений (выход электролитов около 60.0%) наблюдался только после промораживания при температуре – 6°С, а гибель наступала при температуре –9°С. Закаленные растения озимой ржи выживали после промораживания во всем диапазоне температур от –3 до –9°С, а выход электролитов не превышал 30% даже при температуре промораживания –9°С.

#### Ультраструктурная организация хлоропластов растений C. sativus и S. cereale

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что строение клеток столбчатого мезофилла листьев огурца и первого субэпидермального слоя мезофилла листьев озимой ржи представлено слоем цитоплазмы и центральной вакуолью. Хлоропласты обоих видов исследуемых растений имели удлиненно-овальную или округлую форму и всегда располагались в цитозоле вдоль клеточных стенок.

Морфометрические исследования показали, что в процессе закаливания растений огурца наблюдались существенные изменения в ультраструктурной организации хлоропластов (рис. 3а, б). Можно отметить снижение площади хлоропласта более чем на 10% (с 16.27 до 14.54 мкм<sup>2</sup>) и увеличение площади крахмального зерна более чем в 3 раза (табл. 1). При этом количество крахмальных зерен в хлоропласте оставалось неизменным. При закаливании площадь пластоглобулы не изменялась, а количе-



Рис. 2. Выход электролитов (%) из клеток листьев незакаленных и закаленных растений озимой ржи, подвергнутых промораживанию (1 - до промораживания, 2 - после промораживания при температуре –  $3^{\circ}$ С в течение 1 сут, 3 - после промораживания при температуре  $-6^{\circ}$ С в течение 1 сут, 4 - после промораживания при температуре  $-9^{\circ}$ С в течение 1 сут). Достоверные различия средних значений при P < 0.05отмечены разными латинскими буквами над барами.

ство пластоглобул в хлоропласте снижалось более чем на 30% (табл. 1). Что касается изменения ультраструктуры тилакоидной системы хлоропластов, то за время низкотемпературного закаливания площадь одной граны и число гран на срезе хлоропласта достоверно не изменялись (табл. 2). При закаливании происходило снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте (с 206.1 до 172.2 мкм) в результате снижения длины мембран как гранальных, так и стромальных тилакоидов. Коэффициент гранальности при этом не изменялся.

	Огурец		Озимая рожь	
Показатель	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
Площадь среза, мкм <sup>2</sup> :				
хлоропласта	$16.27\pm0.49^{\rm a}$	$14.54\pm0.65^{\text{b}}$	$11.36 \pm 0.37^{c}$	$12.32\pm0.29^{\rm d}$
крахмального зерна	$0.76\pm0.13^{\mathrm{a}}$	$2.34\pm0.48^{\rm b}$	$0.13\pm0.05^{\rm c}$	—
пластоглобулы	$0.02\pm0.006^{\rm a}$	$0.03\pm0.005^{\rm a}$	$0.02\pm0.005^{\rm a}$	$0.02\pm0.005^{\rm a}$
Число на срезе хлоропласта, шт.:				
крахмальных зерен	$2.92\pm0.31^{\rm a}$	$2.89\pm0.28^{\rm a}$	$1.06\pm0.15^{\mathrm{b}}$	—
пластоглобул	$6.44\pm0.45^{\rm a}$	$4.08\pm0.51^{\text{b}}$	$13.30 \pm 0.36^{\circ}$	$14.48\pm0.42^{\rm d}$

**Таблица 1.** Изменение площади и числа структурных элементов хлоропластов листьев растений огурца и озимой ржи при низкотемпературном закаливании

Примечание. Надстрочные латинские буквы обозначают достоверность различий средних значений при *P* < 0.05 по каждому показателю, представленному в таблице.



**Рис. 3.** Изменение ультраструктуры хлоропластов растений огурца при низкотемпературном закаливании (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

У растений озимой ржи за время низкотемпературного закаливания происходило увеличение площади хлоропластов почти на 10% (с 11.36 до 12.32 мкм<sup>2</sup>) (табл. 1). Площадь пластоглобулы не изменялась, а их количество в хлоропласте увеличивалось почти на 10% (табл. 1). После закаливания крахмальные зерна в хлоропластах полностью отсутствовали (рис. 4а, б). У озимой ржи, как и у огурца, в процессе закаливания площадь одной граны и число гран в хлоропласте досто-

верно не изменялись (табл. 2). При этом наблюдалось снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте (с 164.6 до 127.3 мкм). Но, в отличие от огурца, у растений озимой ржи это снижение происходило за счет уменьшения длины мембран гранальных тилакоидов. Протяженность мембран стромальных тилакоидов оставалась без изменений, в результате чего коэффициент гранальности снижался с 1.7 до 1.2 (табл. 2).

	Огурец		Озимая рожь	
Показатель	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
Площадь среза граны, мкм <sup>2</sup>	$0.09\pm0.04^{\rm a}$	$0.11\pm0.05^{\mathrm{a}}$	$0.09\pm0.03^{\rm a}$	$0.08\pm0.04^{\rm a}$
Число гран на срезе, шт.	$21.52\pm5.10^{\rm a}$	$19.10\pm4.82^{\rm a}$	$21.02\pm4.91^{\rm a}$	$20.47\pm5.22^{\rm a}$
Длина мембран гранальных тилакоидов, мкм	$127.6 \pm 8.1^{a}$	$106.6 \pm 9.2^{\mathrm{b}}$	$103.4 \pm 8.7^{\mathrm{b}}$	$69.2 \pm 7.5^{\circ}$
Длина мембран стромальных тилакоидов, мкм	$78.5 \pm 4.6^{\rm a}$	$65.6 \pm 5.2^{\mathrm{b}}$	$61.2\pm5.4^{\mathrm{b}}$	$58.1\pm6.2^{\mathrm{b}}$
Суммарная длина мембран тилакоидов в хлоропласте, мкм	$206.1 \pm 12.5^{a}$	$172.2 \pm 14.2^{b}$	$164.6 \pm 13.6^{b}$	$127.3 \pm 14.3^{\circ}$
Коэффициент гранальности	$1.6\pm0.1^{\mathrm{a}}$	$1.6\pm0.1^{\mathrm{a}}$	$1.7 \pm 0.1^{\mathrm{a}}$	$1.2\pm0.1^{\mathrm{b}}$

**Таблица 2.** Изменение ультраструктуры тилакоидной системы хлоропластов листьев растений огурца и озимой ржи при низкотемпературном закаливании

Примечание. Надстрочные латинские буквы обозначают достоверность различий средних значений при *P* < 0.05 по каждому показателю, представленному в таблице.



**Рис. 4.** Изменение ультраструктуры хлоропластов растений озимой ржи при низкотемпературном закаливании (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

# СО2-газообмен растений С. sativus и S. cereale

При закаливании растений наблюдались существенные изменения  $CO_2$ -газообмена у обоих исследуемых видов. У огурца интенсивность видимого фотосинтеза снижалась в 3 раза (с 4.2 до 1.4 мг  $CO_2/г$  сухой массы ч), а интенсивность темнового дыхания — в 3.5. Это приводило к росту отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание всего на 25% (рис. 5). У озимой ржи величина видимого фотосинтеза за время закаливания уменьшалась только в 2 раза (с 14.5 до 6.9 мг  $CO_2/г$  сухой массы ч), а интенсивность темнового дыхания снижалась, как и у огурца, в 3.5 раза. За счет этого у озимой ржи происходило увеличение отношения видимый фотосинтез/темновое дыхания снижалась, как и у огурца, в 3.5 раза. За счет этого у озимой ржи происходило увеличение отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание более чем в 1.5 раза (рис. 6).

# Содержание сахаров в листьях и корнях C. sativus и S. cereale

Данные по изменению содержания сахаров в листьях и корнях растений огурца при низкотемпературном закаливании представлены в таблице 3. За время низкотемпературного закаливания в листьях огурца наблюдался ~20% рост содержания суммарного количества растворимых сахаров (с 12.5 до 16.2 мг/г сухой массы), который достигался за счет увеличения содержания фруктозы (в 3 раза) и глюкозы (в 1.5 раза). Содержания сахарозы в листьях огурца снижа-

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 68 № 4 2021

лось на 25%. В корнях, в отличие от листьев, суммарное количество растворимых сахаров снижалось на 20% (с 25.5 до 20.2 мг/г сухой массы) за счет уменьшения содержания всех форм сахаров.



**Рис. 5.** Изменение параметров CO<sub>2</sub>-газообмена растений огурца при низкотемпературном закаливании (1 – видимый фотосинтез, 2 – темновое дыхание, 3 – отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание). Достоверные различия средних значений при P < 0.05 отмечены разными латинскими буквами над барами.



**Рис. 6.** Изменение параметров CO<sub>2</sub>-газообмена растений озимой ржи при низкотемпературном закаливании (1 – видимый фотосинтез, 2 – темновое дыхание, 3 – отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание). Достоверные различия средних значений при P < 0.05 отмечены разными латинскими буквами над барами.

В листьях озимой ржи за время закаливания суммарное содержание сахаров возрастало более чем в 3 раза (с 22.2 до 69.2 мг/г сухой массы) в результате увеличения содержания всех форм сахаров, но особенно сильно за счет накопления глюкозы и сахарозы (табл. 4). В корнях озимой ржи отмечалось увеличение суммарного количества растворимых сахаров в 2 раза (с 38.2 до 76.3 мг/г сухой массы), которое обеспечивалось значительным ростом содержания фруктозы, глюкозы и сахарозы.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность низкотемпературного закаливания сильно зависит от видовой специфики исследуемых растений. Одна и та же температура может быть закаливающей для морозостойких видов растений и повреждающей – для теплолюбивых [1]. Именно поэтому мы использовали разные температуры ( $12^{\circ}$ С для огурца и  $2^{\circ}$ С для озимой ржи) при закаливании и различные температуры (3, 0,  $-3^{\circ}$ С для огурца и -3, -6,  $-9^{\circ}$ С для озимой ржи) при оценки устойчивости *С. sativus* и *S. cereale* к гипотермии. Измерение величины выхода электролитов считается одним из достоверных способов оценки степени повреждения растений низкими температурами и широко применяется в научных исследованиях [22].

Полученные нами данные убедительно показали, что оба вида исследуемых растений в результате низкотемпературного закаливания повышали свою устойчивость к гипотермии, но в разной степени. Закаленные растения огурца приобретали способность успешно выдерживать низкие положительные и нулевые температуры, но оказались неспособны сформировать устойчивость к отрицательной температуре. Растения озимой ржи в ходе закаливания существенно повышали свою устойчивость к отрицательным температурам, что характерно для данного вида [23].

Устойчивость растений к холоду во многом зависит от функционирования хлоропластов, реорганизация ультраструктуры которых является одним из факторов низкотемпературного закаливания [24]. Наши исследования выявили ряд существенных изменений в организации тилакоидной системы хлоропластов при закаливании растений огурца и озимой ржи. К числу общих для обоих видов ультраструктурных изменений можно отнести снижение суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте на 20 – 30%. Поскольку при гипотермии интенсивность фотосинтеза лимитируется, главным образом, активностью ключевых ферментов цикла Кальвина [25], то можно предположить, что в хлоропластах растений огурца и озимой ржи происходило снижение длины тилакоидных мембран, избыточных для обеспечения фотосинтетической

Вариант опыта	Содержание сахаров, мг/г сухой массы				
	фруктоза	глюкоза	сахароза	сумма сахаров	
Лист					
Незакаленные растения	$0.8\pm0.2^{\mathrm{a}}$	$5.9\pm0.5^{\mathrm{a}}$	$5.8\pm0.4^{\mathrm{a}}$	$12.5\pm0.9^{\mathrm{a}}$	
Закаленные растения	$2.3\pm0.5^{\mathrm{b}}$	$9.5\pm0.3^{\mathrm{b}}$	$4.4\pm0.3^{b}$	$16.2 \pm 1.1^{b}$	
Корень					
Незакаленные растения	$2.5\pm0.2^{\mathrm{b}}$	$19.1\pm0.9^{\circ}$	$3.9\pm0.2^{\mathrm{b}}$	$25.5 \pm 1.6^{\circ}$	
Закаленные растения	$1.9\pm0.3^{b}$	$15.3 \pm 1.2^{d}$	$3.0\pm0.3^{c}$	$20.2 \pm 1.7^{d}$	

**Таблица 3.** Изменение содержания сахаров в листьях и корнях растений огурца при низкотемпературном закаливании

Примечание. В каждом столбце величины, достоверно различающиеся при *P* < 0.05, обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

Вариант опыта	Содержание сахаров, мг/г сухой массы				
	фруктоза	глюкоза	сахароза	сумма сахаров	
Лист					
Незакаленные растения	$1.2\pm0.1^{\mathrm{a}}$	$8.6\pm0.7^{\mathrm{a}}$	$12.4 \pm 1.6^{a}$	$22.2 \pm 2.2^{\mathrm{a}}$	
Закаленные растения	$3.7\pm0.6^{\mathrm{b}}$	$25.1\pm2.5^{\mathrm{b}}$	$40.4 \pm 4.1^{\mathrm{b}}$	$69.2 \pm 7.1^{b}$	
Корень					
Незакаленные растения	$2.6\pm0.7^{\mathrm{b}}$	$14.7 \pm 1.8^{c}$	$20.9 \pm 1.7^{\circ}$	$38.2 \pm 4.4^{c}$	
Закаленные растения	$4.9\pm0.5^{\rm c}$	$33.3\pm4.2^{d}$	$38.1 \pm 3.4^{b}$	$76.3 \pm 7.7^{\mathrm{b}}$	

**Таблица 4.** Изменение содержания сахаров в листьях и корнях растений озимой ржи при низкотемпературном закаливании

Примечание. В каждом столбце величины, достоверно различающиеся при *P* < 0.05, обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

активности в условиях закаливающих температур. Важно отметить, что у растений озимой ржи, в отличие от огурца, снижение суммарной длины мембран тилакоидов сопровождалось существенным изменением соотношения длины гранальных и стромальных тилакоидов в хлоропласте. Коэффициент гранальности хлоропластов озимой ржи снижался на 30% за счет уменьшения длины мембран гранальных тилакоидов при сохранении длины мембран тилакоидов стромы на уровне незакаленных растений. Данная перестройка мембранной системы хлоропластов озимой ржи, по-видимому, была направлена на увеличение доли стромальных тилакоидов, содержаших компоненты более устойчивой к холоду ФС I. и на снижение доли гранальных тилакоидов, в которых локализованы компоненты чувствительной к холоду ФС II [11].

Можно предположить, что в результате таких изменений фотосинтетический аппарат озимой ржи окажется более адаптированным к пониженным температурам по сравнению с растениями огурца. Действительно, наши эксперименты показали, что при температурах холодового закаливания интенсивность видимого фотосинтеза у озимой ржи снижалась в 2 раза по сравнению с незакаленными растениями, в то время как у огурца – в 3 раза (рис. 5, 6). Важной особенностью СО<sub>2</sub>-газообмена растений огурца и озимой ржи являлось то, что интенсивность видимого фотосинтеза за время закаливания уменьшалась в меньшей степени, чем интенсивность темнового дыхания. Это приводило к увеличению отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание, что является предпосылкой накопления большого количества продуктов фотосинтеза в условиях низких температур [20].

Помимо перестройки тилакоидной системы хлоропластов, при закаливании *C. sativus* и *S. ce-reale* происходили существенные изменения площади хлоропластов и крахмальных зерен. Изменение площади хлоропластов является одной из наиболее часто встречающихся реакций в ответ на действие холода [10]. Как правило, происходит увеличение площади хлоропластов за счет разбухания их стромы, что связывают с осмотическими явлениями, а именно - с накоплением совместимых осмолитов (сахаров, пролина, глицин-бетаина), которые защищают хлоропласты от обезвоживания, а также выполняют криопротекторные, антиоксидантные и резервные функции [26]. В наших экспериментах наблюдалось уменьшение площади хлоропласта у огурца и её увеличение у озимой ржи примерно на 10%. Такие диаметрально противоположные реакции хлоропластов могут быть связаны с различиями в накоплении и распределении продуктов фотосинтеза в исследуемых растениях. Из данных таблиц 3 и 4 видно, что за время закаливания в листьях огурца суммарное содержание сахаров увеличилось только на 20%, в то время как в листьях озимой ржи – более чем в 3 раза. У огурца в то же время происходил интенсивный синтез крахмала (рост площади крахмальных зерен более чем в 3 раза), а у озимой ржи крахмальные зерна отсутствовали.

Столь значительные различия между растениями огурца и озимой ржи могут быть связаны с особенностями транспорта ассимилятов из листьев в корни у этих растений. Известно, что C. sativus имеет преимущественно симпластный транспорт ассимилятов, который отличается крайней чувствительностью к холоду и полностью прекращается при температурах ниже 7-8°С. Напротив, для S. cereale свойствен преимущественно апопластный транспорт ассимилятов, который сопряжен с высоким осмотическим давлением клеточного раствора и сохраняется в диапазоне низких положительных температур [27]. Экспериментальные данные по изменению содержания сахаров в корнях огурца и озимой ржи подтверждают это предположение. Снижение содержания растворимых сахаров в корнях огурца в конце периода закаливания может свидетельствовать о торможении оттока ассимилятов и возникновении дефицита сахаров в корнях. В пользу этой гипотезы свидетельствует и снижение содержания транспортной формы сахаров (сахарозы) не только в корнях, но и в листьях огурца (табл. 3). В отличие от *C. sativus*, в корнях *S. cereale* содержание растворимых сахаров увеличивалось в 2 раза, что дает основания предположить сохранение оттока ассимилятов из листьев в корни в условиях закаливающей температуры (табл. 4).

Обеспечение сахарами всех органов и тканей растения является важнейшим условием для успешного закаливания целого растения к гипотермии [28]. Эта задача достигалась за счет того, что донор ассимилятов – фотосинтез продолжал функционировать у обоих видов исследуемых растений, несмотря на полное подавление низкими температурами основного акцептора ассимилятов – ростовых процессов. Считается, что в таких условиях поддержание фотосинтеза становится возможным благодаря накоплению продуктов фотосинтеза в цитозоле и в новообразованных ультраструктурных элементах клетки (крахмальные зерна, пластоглобулы), а также за счет синтеза более восстановленных химических соединений (МГДГ, ДГДГ, увеличение доли ПНЖК в составе липидов) [29]. Последнее позволяет поддерживать текучесть мембран и сохранять мембрансвязанные функции клеток растений в условиях гипотермии [30].

Таким образом, на основе полученных данных можно констатировать, что у растений *C. sativus* и S. cereale реорганизация ультраструктуры хлоропластов была тесно связана с формированием устойчивости к гипотермии. При этом у теплолюбивых растений огурца и у морозостойких растений озимой ржи четко проявлялась видовая специфика в изменении ультраструктурной организации хлоропластов, что во многом определяло эффективность низкотемпературного закаливания данных видов. У растений огурца за время закаливания перестройка ультраструктуры тилакоидной системы ограничивалась лишь снижением суммарной длины мембран тилакоидов в хлоропласте и не сопровождалась изменением соотношения длины мембран гранальных и стромальных тилакоидов. Увеличение площади крахмальных зерен в хлоропластах огурца в 3 раза свидетельствовало о выведении значительной части продуктов фотосинтеза из осмотического пула. Такие изменения ультраструктуры хлоропластов огурца, по-видимому, ограничивали продуктивность фотосинтеза и возможность накапливать растворимые сахара, что лимитировало эффективность закаливания C. sativus лишь возможностью развивать устойчивость к низким положительным и нулевым температурам.

При закаливании озимой ржи перестройка ультраструктуры тилакоидной системы не ограничивалась лишь снижением суммарной длины мем-

бран тилакоидов в хлоропласте, но и сопровождалась уменьшением коэффициента гранальности хлоропластов. Можно предположить, что формирование хлоропластов с пониженным коэффициентом гранальности, содержащих большую долю устойчивых к холоду мембран стромальных тилакоидов, было направлено на сохранение функциональной активности хлоропластов S. cereale в условиях закаливающих температур [3, 4]. Поддержание фотосинтеза на более высоком, чем у огурца уровне, а также отсутствие синтеза крахмала в хлоропластах давало возможность кратно увеличивать содержание растворимых сахаров в клетках озимой ржи. Последнее предотвращало внутриклеточное льдообразование, обеспечивало зашиту клеток от обезвоживания в условиях образования льда в межклетниках [2] и тем самым создавало возможность для формирования устойчивости S. cereale к отрицательным температурам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания (номер темы 121040800153-1 "Механизмы адаптации растений к факторам аридизации глобального климата и антропогенному загрязнению окружающей среды").

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Трунова Т.И*. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
- 2. *Margesin R., Neuner G., Storey K.B.* Cold-loving microbes, plants, and animals fundamental and applied aspects // Naturwissenschaften. 2007. V. 94. P. 77.
- 3. Venzhik Y.V., Shchyogolev S. Y., Dykman L. A. Ultrastructural reorganization of chloroplasts during plant adaptation to abiotic stress factors // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 850. https://doi.org/10.1134/S102144371906013X
- Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // Plant Cell Environ. 2000. V. 23. P. 337.
- 5. *Ma S., Lin C., Chen Y.* Comparative studies of chilling stress on alterations of chloroplast ultrastructure and protein synthesis in the leaves of chilling-sensitive (mung bean) and insensitive (pea) seedlings // Bot. Bull. Acad. Sin. 1990. V. 31. P. 263.
- Deryabin A.N., Sinkevich M.S., Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. CO<sub>2</sub> exchange and structural organization of chloroplasts under hypothermia in potato plants transformed with a gene for yeast invertase // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 450. https://doi.org/10.1134/S1021443707040036
- Трунова Т.И., Астахова Н.В. Роль ультраструктуры клеток в формировании морозостойкости озимой пшеницы // Докл. АН. 1998. Т. 359. С. 120.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ том 68 № 4 2021

- 8. *Popov V.N., Antipina O.V., Astakhova N.V.* Changes in chloroplast ultrastructure of tobacco plants in the course of protection from oxidative stress under hypothermia // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 301. https://doi.org/10.1134/S1021443716030110
- 9. *Smillie R.M., Critchley C., Bain J.M., Nott R.* Effect of growth temperature on chloroplast structure and activity in barley // Plant Physiol. 1978. V. 62. P. 191.
- Venzhik Y.V., Titov A.F., Talanova V.V., Miroslavov E.A., Koteeva N.K. Structural and functional reorganization of the photosynthetic apparatus in adaptation to cold of wheat plants // Cell Tissue Biol. 2013. V. 7. P. 168. https://doi.org/10.1134/S1990519X13020132
- Pribil M., Labs M., Leister D. Structure and dynamics of thylakoids in land plants // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1955. https://doi.org/10.1093/jxb/eru090
- Wijk K.J., Kessler F. Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation // Annu. Rev. Plant Biol. 2017. V. 68. P. 253. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111737
- Климов С.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И. Сопряженные изменения морозостойкости, фотосинтеза и дыхания, ультраструктуры клеток и хлоропластов у озимой пшеницы и ржи при холодовом закаливании // Докл. АН. 1994. Т. 337. С. 276.
- 14. Wise R.R., McWilliam J., Naylor A.W. A comparative study of low-temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities // Plant Cell Environ. 1983. V. 6. P. 525.
- Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Relationship between plant cold tolerance, photosynthesis and ultrastructural modifications of cells and chloroplasts // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 44. P. 759.
- Vella N.G.F., Joss T.V., Roberts T.H. Chilling induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming // Protoplasma. 2012. V. 249. P. 1137.

https://doi.org/10.1007/s00709-011-0363-5

- Nagler M., Nukarinen E., Weckwerth W., Nägele T. Integrative molecular profiling indicates a central role of transitory starch breakdown in establishing a stable C/N homeostasis during cold acclimation in two natural accessions of *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. 2015. V. 15. Article 284. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0668-1
- Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., Nunes M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. Plants // J. Plant

Physiol. 2003. V. 160. P. 283. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833

- Трунова Т.И., Астахова Н.В., Дерябин А.Н., Сабельникова Е.П. Ультраструктурная организация хлоропластов листьев растений картофеля, трансформированного геном дрожжевой инвертазы, в норме и при гипотермии // Докл. АН. 2003. Т. 389. С. 842.
- Климов С.В. Холодовое закаливание растений результат поддержания повышенного отношения фотосинтез/дыхание при низких температурах // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. Т. 30. С. 57.
- Туркина М.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 7.
- 22. Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hincha D.K. Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of Arabidopsis thaliana accessions // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1860. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x
- Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Changes in Photosynthesis, Dark Respiration Rates and Photosynthetic Carbon Partitioning in Winter Rye and Wheat Seedlings during Cold Hardening // J. Plant Physiol. 1999. V. 155. P. 734.
- Crosatti C., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Cattivelli L. Harden the chloroplast to protect the plant // Physiol. Plant. 2013. V. 147. P. 55. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x
- Du Y.C., Nose A., Wasano K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species // Plant Cell Environ. 1999. V. 22. P. 317.
- Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // Planta. 2012. V. 235. P. 1091. https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y
- 27. Gamalei Y.V., Pakhomova M.V., Sjutkina A.V. Ecological aspects of assimilate export. Temperature // Fiziol. Rast. 1992. V. 39. P. 1068.
- Климов С.В., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Астахова Н.В, Попов В.Н., Алиева Г.П., Трунова Т.И. Связь СО<sub>2</sub>-газообмена с накоплением сахаров и активностью инвертаз при холодовом закаливании озимой пшеницы // Докл. АН. 2004. Т. 398. С. 135.
- Klimov S.V., Trunova T.I., Mokronosov A.T. Mechanism of plant adaptation to unfavourable environments via changes in source-sink relations // Fiziol. Rast. 1990. V. 37. P. 1024.
- Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. 2005. Т. 75. С. 338.