

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

РОЛЬ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОК В АДАПТАЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ К НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

© 2023 г. Ю. В. Венжик^a, *, И. Е. Мошков^a

^a Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: jul.venzhik@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 28.03.2023 г.

На проростках морозостойкого сорта озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) изучали изменения ультраструктурной организации клеток мезофилла, происходящие в процессе низкотемпературной адаптации (4°C, 7 сут). Установлено, что под влиянием низкой закалывающей температуры клетки листьев пшеницы увеличивались в размерах, при этом возрастала площадь цитоплазмы, в то время как размеры вакуоли уменьшались. Электронная плотность цитоплазмы визуально увеличивалась, в ней появлялись многочисленные везикулы. Кроме того, увеличивались размеры хлоропластов, а также количество хлоропластов, митохондрий и пероксисом на единицу площади среза клетки. Скопления митохондрий и пероксисом в виде цепочек были отмечены около хлоропластов в клетках закаленных проростков, а сами митохондрии изменяли свою форму с округлой на вытянутую или гантелевидную. Низкая температура также влияла на форму хлоропластов, которые из линзовидных становились более округлыми, в них обнаруживались выросты (стромулы). Значительные изменения под влиянием низкой температуры происходили в ультраструктуре хлоропластов: увеличивалось количество и размеры пластогбул, полностью исчезали крахмальные включения, снижались количество гран, среднее число тилакоидов в гране, высота и площадь грани, плотность фотосинтетических мембран в хлоропласте коэффициент его гранальности (отношение длины мембран тилакоидов в гранах к длине мембран стромальных тилакоидов). При этом в процессе низкотемпературного закалывания формировалась повышенная морозоустойчивость пшеницы, которую анализировали по выживаемости проростков и выходу электролитов из тканей листа после тестирующего промораживания. Показана взаимосвязь обнаруженных структурных трансформаций в клетках листьев пшеницы с функциональными и физиолого-биохимическими изменениями, происходящими у холодостойких растений в процессе низкотемпературной адаптации. Предполагается, что наблюдаемая ультраструктурная реорганизация клеток является одним из важных компонентов в сложной программе адаптации, а также звеном, необходимым для формирования повышенной устойчивости озимых злаков к низкой температуре.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, адаптация, вакуоль, мезофилл, митохондрии, низкая температура, пероксисомы, ультраструктура, устойчивость, хлоропласты, цитоплазма

DOI: 10.31857/S0015330323600250, **EDN:** WXBWLW

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть регионов Российской Федерации относится к территориям с неблагоприятными климатическими условиями, в первую очередь температурными, что является причиной существенных потерь урожая важных сельскохозяйственных культур. Климатическая нестабильность диктует необходимость изучения всех возможных механизмов и стратегий адаптации растений к изменениям температуры. Особую актуальность имеют исследования процессов низкотемпературной адаптации

холодостойких растений, например озимых злаков, поскольку такие исследования позволяют анализировать адаптивный потенциал растительного организма в целях дальнейшей селекции видов и сортов, наиболее устойчивых к охлаждению и способных акклиматизироваться в северных широтах.

Механизмы холодоустойчивости реализуются на разных уровнях организации растительного организма — от структурного до молекулярно-генетического. Под влиянием низких температур метаболизм растений, устойчивых к холоду, полностью изменяется: “включаются” гены холодового ответа [1–3]; в клетках и тканях накаплива-

Сокращения: АОС — антиоксидантная система, ФСА — фотосинтетический аппарат.

ются белки, углеводы и аминокислоты, выполняющие функции осмолитиков и криопротекторов [4–6]. Кроме того, изменяется биохимический состав мембран, в которых увеличивается соотношение липиды/белки и возрастает количество ненасыщенных жирных кислот [1, 2, 4, 7, 8]. Важную роль в процессе низкотемпературной адаптации растений играет антиоксидантная система (АОС), представленная антиоксидантными ферментами и низкомолекулярными соединениями [5, 8, 9].

Определенное место в программе адаптации растений к низкой температуре занимает и ультраструктурная реорганизация клеток, которая, в зависимости от вида растения и степени охлаждения, может в разной степени затрагивать основные органеллы [4, 10–12]. Особый интерес представляет изучение адаптивных структурных изменений клеток листа, как основного фотосинтезирующего органа растений. Однако экспериментальные данные по этому вопросу достаточно противоречивы, и даже среди холодостойких растений разброс по структурным реакциям на охлаждение может быть достаточно большим [13]. Прежде всего, это связано с тем обстоятельством, что характер любых изменений, происходящих в растительном организме при длительных низкотемпературных воздействиях, существенно зависит от диапазона используемых температур. Согласно гипотезе о зональном влиянии температуры на растения [14], озимая пшеница относится к морозостойким культурам, способным выдерживать без повреждений даже действие температур близких к 0°C. Зона низких закаливающих температур, вызывающих увеличение ее морозоустойчивости, находится в диапазоне от 0 до 14°C. Температуры ниже 0°C относятся к повреждающим, а температуры в диапазоне от 14 до 28°C – к “фоновым”, то есть физиологически нормальным [14]. Как показали наши предыдущие исследования, существует зависимость степени и характера проявления адаптивных функциональных и физиолого-биохимических изменений в клетках и тканях озимой пшеницы от интенсивности закаливающей температуры: наиболее быстрые и заметные адаптивные изменения происходили при температуре 4°C, вызывающей наибольший приrost морозоустойчивости, который развивался к 6–7 сут закаливания [15]. С целью показать роль ультраструктурной реорганизации клеток в низкотемпературной адаптации озимых злаков, мы изучили комплекс ультраструктурных изменений, происходящих в клетках мезофилла у проростков озимой пшеницы в процессе низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали недельные проростки озимой пшеницы (*Triticum*

aestivum L.) морозостойкого сорта Московская 39, выращенные в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, относительной влажности 60–70%, освещенности 100 мкмоль/(м² с) и 16-часовом фотопериоде. Растения закаляли в климатической камере KBW-240 (“Binder”, Германия) при 4°C в течение 7 сут, сохраняя прочие условия неизменными. В качестве контроля использовали 7-дневные проростки, выращенные при 22°C.

Для электронно-микроскопического исследования высечки листа фиксировали по стандартной методике: 2% глутаральдегидом на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) при температуре 0–4°C с постфиксацией в 2% растворе OsO₄ [16]. После стандартной процедуры обезвоживания в серии спиртов и ацетона материал заливали в смесь эпоксидных смол. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 (“LKB”, Швеция) и просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (“JEOL Ltd.”, Япония). Морфометрический анализ ультраструктуры проводили с использованием компьютерных программ ITEM 5.0. и AxionVision 4.8.

Устойчивость пшеницы к низкой температуре оценивали методом прямого промораживания проростков (по выживаемости) и по выходу электролитов из тканей. В каждом варианте опыта (контрольные и закаленные проростки) брали по 30 растений и промораживали их в бумажных конвертах в климатической камере MIR-153 (“Sanyo”, Япония) с интервалом в 24 ч и шагом в 2°C. Пробы отбирали при постепенном снижении температуры: при –3, –5, –7 и –9°C. Затем растения 24 ч выдерживали при 4°C в темноте, после чего переносили в обычные условия (22°C, дневной свет) на 72 ч. О выживаемости судили по количеству неповрежденных проростков в процентах от общего числа промороженных растений. Выход электролитов из тканей листа оценивали по стандартной процедуре [17] после их 24 ч промораживания в климатической камере MIR-153 (“Sanyo”, Япония) при температурах –3, –5, –7 и –9°C. Электропроводность водных экстрактов определяли при помощи кондуктометра SG7-ELK (“Mettler Toledo”, Швейцария). Выход электролитов из тканей листьев (*V*, в %) рассчитывали по формуле:

$$V = 100 (L_o / L_k),$$

где *L_o* – электропроводность исследуемого образца до или после холодовой экспозиции, *L_k* – электропроводность того же образца после кипячения.

Все измерения проводили на первом листе проростков пшеницы. Ультраструктурные показатели изучали на 50–100 снимках для каждого варианта опыта. Повторность при оценке устойчивости была 3–6-кратная. В таблицах и на графиках приведены средние арифметические зна-

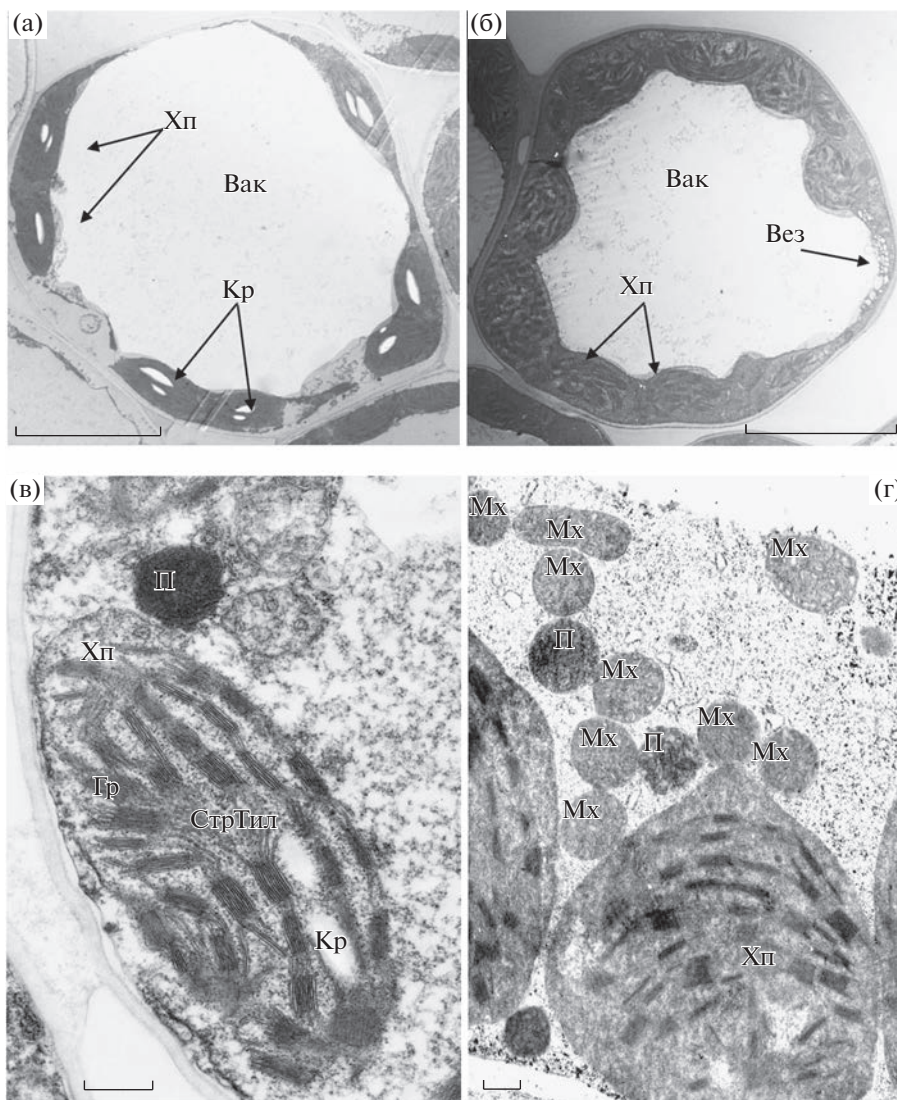


Рис. 1. Ультраструктура клеток мезофилла у контрольных (а, в) и закаленных (4°C, 7 сут) (б, г) проростков пшеницы. Вак – вакуоль, Хп – хлоропласт, Мх – митохондрия, Пс – пероксисома, Вез – везикулы, Кр – крахмальные включения, Гр – граны, СтрТил – тилакоиды стромы. Масштабная линейка 5 мкм (а, б) и 0.5 мкм (в, г).

чения и их стандартные ошибки. Достоверности отличий между средними значениями оценивали по *t*-критерию Стьюдента при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование показало, что клетки мезофилла незакаленных проростков пшеницы имели типичную структуру. В тонком пристенном слое цитоплазмы располагались хлоропласты линзовидной формы, в которых хорошо видны крахмальные включения, а центральная часть клетки занята прозрачной вакуолью (рис. 1а). После низкотемпературного закаливания в структуре клеток пшеницы обнаружен ряд отличий. В частности, цитоплазма клеток несколько разрасталась, в ней увеличивалось количество хлоропластов, ко-

торые по размерам были больше контрольных, причем в них полностью исчезали крахмальные включения (рис. 1б). Кроме того, визуально увеличивалась плотность цитоплазмы, в ней появлялись скопления везикул (рис. 1б, г). Около хлоропластов отмечено появление “цепочек” из митохондрий и пероксисом (рис. 1г). Сами митохондрии нередко меняли свою форму, становясь из округлых более вытянутыми или гантелевидными (рис. 2а, б). Зафиксировано также увеличение электронной плотности стромы хлоропластов (рис. 1г) по сравнению с хлоропластами контрольных растений (рис. 1в). Заметно, что хлоропласты закаленных растений были более округлыми (рис. 1б, г), в них обнаруживались выросты, так называемые – стромулы. Нередко эти стромулы формировали “карманоподобные” образования с пероксисомами

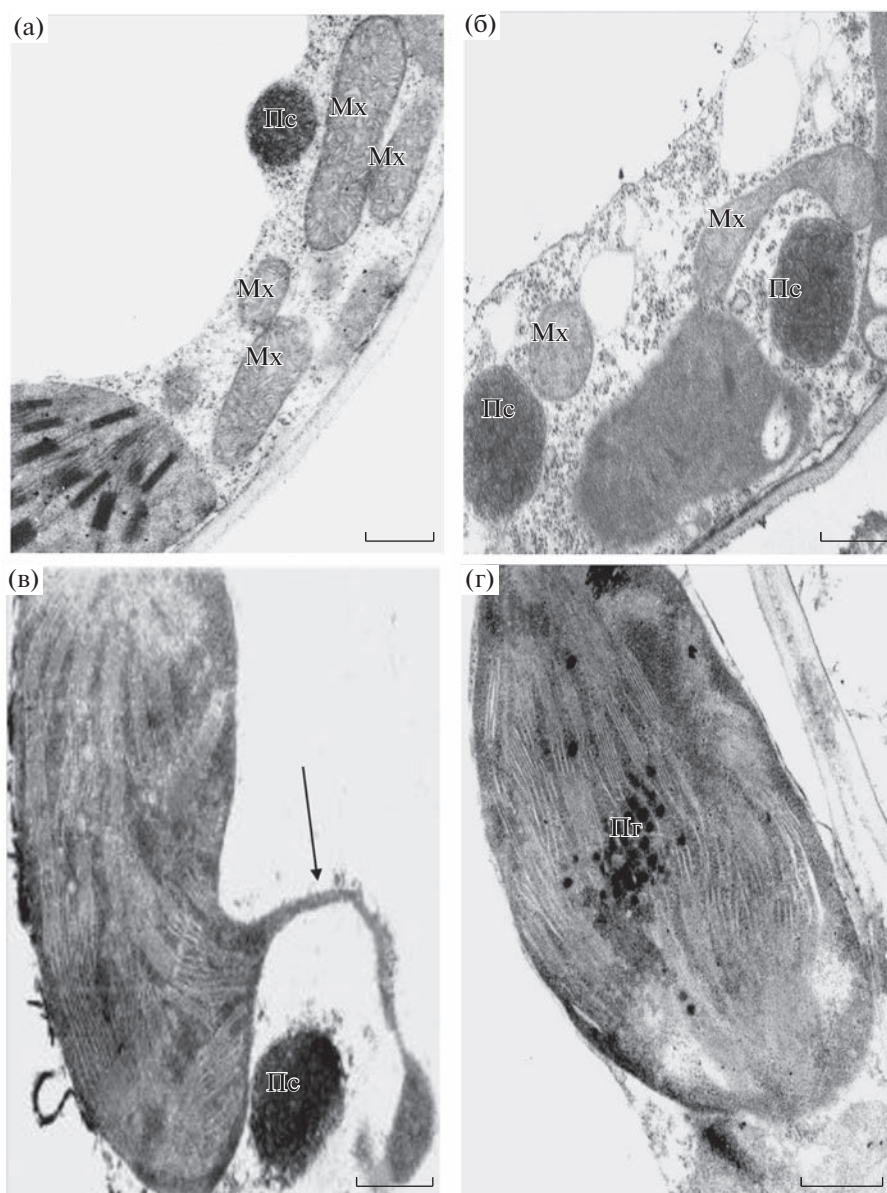


Рис. 2. Ультраструктура клеток мезофилла у закаленных (4°C, 7 сут) проростков пшеницы. Мх — митохондрия, Пг — пластоглобулы, Пс — пероксисома. На рис. 2в стрелкой показана стромула. Масштабная линейка 0.5 мкм.

или митохондриями внутри (рис. 2в). Достаточно часто в хлоропластах закаленных проростков наблюдали искривленные тилакоиды с расширенным люменом (внутритилакоидным пространством) (рис. 2г). Действие низких температур приводило также к увеличению в хлоропластах размеров и количества пластоглобул, которые иногда образовывали “гроздеподобные” кластеры, хорошо заметные в центральной части пластид (рис. 2г).

Морфометрический анализ подтвердил, что в процессе низкотемпературного закаливания в клетках мезофилла пшеницы происходит ряд структурных изменений. Так, под влиянием низкой температуры увеличивались площади срезов клетки

и цитоплазмы (рис. 3а). При этом, размеры вакуоли, наоборот, уменьшались, и в процентах по отношению к площади клетки это снижение составило 30% (рис. 3б). Кроме того, в условиях низкотемпературного закаливания увеличивалось число хлоропластов, митохондрий и пероксисом на единицу площади среза клетки (рис. 4), а также значительно возрастали размеры хлоропластов, хотя площади срезов митохондрий и пероксисом не изменялись (табл. 1). Так, площадь среза хлоропласта увеличивалась в процессе закаливания более чем в два раза, причем как длинная, так и короткая оси хлоропластов были заметно больше, чем у контрольных растений (табл. 1). Однако соотноше-

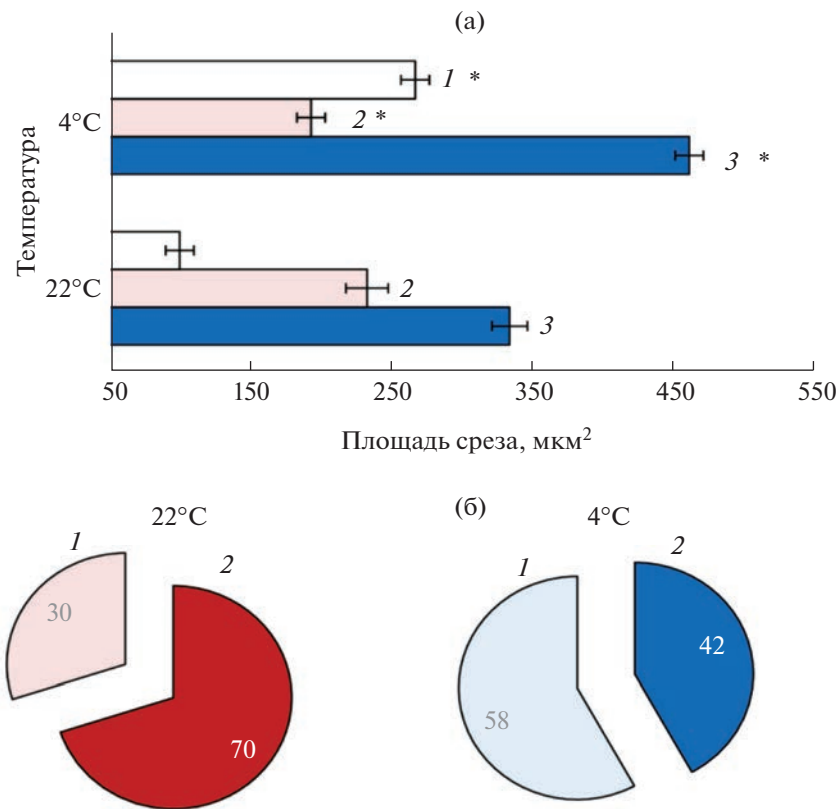


Рис. 3. Влияние низкой температуры (4°C, 7 сут) на размеры (а) цитоплазмы (1), вакуоли (2) и клетки (3) и соотношение (б) площадей цитоплазмы (1) и вакуоли (2) в % от площади клетки у проростков пшеницы. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при $P < 0.05$.

ние длинной оси хлоропласта к короткой снижалось (табл. 1), что говорит о потере хлоропластами линзовидной формы и некотором их округлении (рис. 1б, г). Увеличение количества и размеров хлоропластов приводило к возрастанию их суммарной площади в клетке на 15% по сравнению с контрольными значениями (табл. 2).

Существенные отличия были зафиксированы и в ультраструктуре хлоропластов закаленных и незакаленных растений. У контрольных проростков, выращенных при 22°C, хлоропласты облада-

ли типичной структурой: имели правильную линзовидную форму, хорошо развитую тилакоидную систему и мелкозернистую плотную строму, в которой располагались граны, тилакоиды стромы и крахмальные включения (рис. 1в). При 4°C в хлоропластах листьев пшеницы происходил ряд структурных изменений: существенно (на 25%) снижалось число гран на единице площади хлоропласта, уменьшалось и среднее число тилакоидов в гране (табл. 2). О заметном уменьшении размеров гран свидетельствует также снижение как

Таблица 1. Влияние низкой температуры (4°C, 7 сут) на размеры органелл в клетках мезофилла у проростков пшеницы

Показатели	22°C	4°C
Площадь среза пероксисомы, μm^2	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Площадь среза митохондрии, μm^2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Площадь среза хлоропласта, μm^2	7.9 ± 0.4	$16.1 \pm 0.6^*$
Длинная ось хлоропласта, мкм	4.6 ± 0.2	$5.9 \pm 0.2^*$
Короткая ось хлоропласта, мкм	1.9 ± 0.1	$2.9 \pm 0.1^*$
Длинная/короткая ось хлоропласта	2.5 ± 0.1	$2.0 \pm 0.1^*$

Примечание. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при $P < 0.05$.

средней, так и максимальной высоты грани и ее площади (табл. 2). Достоверных изменений в величине люмена (расстояния между тилакоидами в грани) не обнаружено (табл. 2). Снижение плотности фотосинтетических мембран (то есть длины мембран тилакоидов, рассчитанной на 10 мкм^2 площади среза хлоропласта) происходило, прежде всего, за счет уменьшения длины гранальных мембран (табл. 2). Вследствие этого у закаленных растений коэффициент гранальности, представляющий отношение длины мембран гранальных тилакоидов к длине стромальных мембран, был заметно снижен по сравнению с контрольными значениями (табл. 2). Этот факт свидетельствует о преобладании в хлоропластах закаленных растений мембран стромальных тилакоидов над мембранами тилакоидов в гранах.

В процессе низкотемпературного закаливания пшеницы происходила не только структурная реорганизация клеток мезофилла, но и формировалась повышенная морозоустойчивость. В опытах с прямым промораживанием растений показано, что 90% незакаленных проростков полностью погибали уже при -7°C , в то время как 40% закаленных растений выдерживали промораживание даже при -9°C (табл. 3). Данные по определению выхода электролитов из тканей после промораживания также свидетельствуют об увеличении морозоустойчивости пшеницы в процессе закаливания (табл. 3). Согласно этим данным, устойчивость закаленных растений была приблизительно в три раза выше, чем у контрольных проростков. Так, выход электролитов из тканей контрольных проростков, замороженных при -7°C , составил 70%,

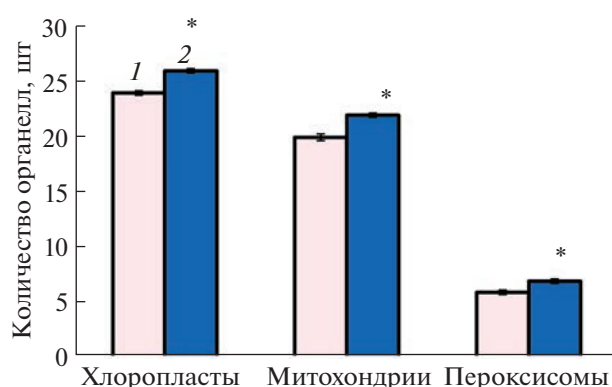


Рис. 4. Влияние низкой температуры (4°C , 7 сут) на количество органелл на 10^3 мкм^2 площади среза клетки у проростков пшеницы: 1 – 22°C , 2 – 4°C . Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при $P < 0.05$.

что свидетельствует о гибели большинства растений. У закаленных проростков выход электролитов после промораживания при этой же температуре был лишь 20%, а при снижении температуры до -9°C составил 35% (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Холодостойкие растения в процессе эволюции сформировали широкий спектр адаптивных структурно-функциональных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических изменений, способствующих выживанию в условиях действия пониженных температур. Эти изменения касаются,

Таблица 2. Влияние низкой температуры (4°C , 7 сут) на ультраструктуру хлоропластов в клетках мезофилла у проростков пшеницы

Показатели	22°C	4°C
Суммарная площадь хлоропластов, %	21 ± 3	$35 \pm 3^*$
Число гран на 10 мкм^2 среза хлоропласта, шт	37 ± 2	$28 \pm 3^*$
Среднее число тилакоидов в грани, шт	7 ± 0.2	$6 \pm 0.2^*$
Средняя высота грани, мкм	0.13 ± 0.01	$0.10 \pm 0.01^*$
Наибольшая высота грани, мкм	0.40	0.23
Ширина люмена, мкм ^а	0.018 ± 0.001	0.021 ± 0.001
Площадь грани, мкм ²	0.05 ± 0.003	$0.03 \pm 0.003^*$
Плотность гранальных мембран, мкм ^б	124.2 ± 19.8	$70.0 \pm 9.2^*$
Плотность стромальных мембран, мкм	92.8 ± 15.0	66.9 ± 10.2
Общая плотность фотосинтетических мембран, мкм	217.0 ± 23.6	$136.9 \pm 14.9^*$
Коэффициент гранальности хлоропласта ^в	1.3 ± 0.1	$1.0 \pm 0.1^*$

Примечание. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при $P < 0.05$; а – ширину люмена (расстояние между тилакоидами в грани) рассчитывали как отношение высота грани/среднее число тилакоидов в грани; б – плотность мембран рассчитывали как длину (протяженность) мембран на 10 мкм^2 среза хлоропласта; в – коэффициент гранальности рассчитывали как отношение длины гранальных мембран к длине мембран, контактирующих со стромой.

Таблица 3. Морозоустойчивость проростков пшеницы к низкой температуре до и после закаливания (4°C, 7 сут)

Температура промораживания	Выживаемость, %		Выход электролитов, %	
	незакаленные проростки	закаленные проростки	незакаленные проростки	закаленные проростки
–3°C	35 ± 5	65 ± 5*	35.4 ± 5.0	11.0 ± 1.2*
–5°C	10 ± 4	55 ± 5*	57.7 ± 3.3	16.3 ± 0.3*
–7°C	0	50 ± 4*	70.3 ± 3.1	20.3 ± 1.2*
–9°C	0	40 ± 5*	—	35.2 ± 1.2*

Примечание. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при $P < 0.05$.

в том числе, и ультраструктуры клеток, которая в процессе низкотемпературной адаптации претерпевает значительную реорганизацию. В нашем исследовании, проведенном на проростках озимой пшеницы, установлено, что в процессе низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут) в клетках мезофилла происходит целый комплекс структурных изменений, касающихся практически всех элементов клетки. В частности, значительно увеличивались размеры самих клеток мезофилла, в которых возрастала площадь и электронная плотность цитоплазмы, в ней появлялись многочисленные везикулы, увеличивались число хлоропластов, митохондрий и пероксисом, а также размеры хлоропластов (табл. 1, рис. 1–4). Скопления митохондрий и пероксисом наблюдались около хлоропластов, в самих хлоропластах отмечены выросты — стромулы, в них увеличивались размеры и количество пластоглобул, но практически полностью исчезали крахмальные включения (рис. 1, 2). Кроме того, в хлоропластах появлялись признаки снижения гранальности — уменьшались число и размеры гран, плотность фотосинтетических мембран снижалась за счет уменьшения гранального компонента, мембраны стромальных тилакоидов преобладали над мембранами гран (табл. 2). При этом, в процессе ультраструктурной реорганизации клеток мезофилла под влиянием низкой температуры формировалась повышенная морозоустойчивость пшеницы (табл. 3).

В предыдущем исследовании нами показано, что при низкотемпературном закаливании озимой пшеницы происходит “перепрограммирование” метаболизма, включающее адаптивные изменения роста, водного обмена, интенсивности окислительных процессов и работы фотосинтетического аппарата (ФСА) [15]. Большой интерес представляют исследования не только функциональных и физиолого-биохимических, но и структурных механизмов адаптации растений к действию низких температур, однако таких работ явно недостаточно [13, 18, 19]. Прежде всего, это связано с тем обстоятельством, что для структурных признаков четкие критерии их адаптивности на сегодняшний день не определены. На наш взгляд, оценить зна-

чимость того или иного структурного признака для клетки вполне возможно, проведя анализ тех функциональных и/или физиолого-биохимических изменений, которые сопровождают структурные перестройки. Добавим, что в таких исследованиях необходим и параллельный контроль устойчивости, как интегрального показателя, величина которого обеспечена реализацией комплекса адаптивных изменений. Вполне можно предполагать, что изменения структуры, сопровождающие рост холодоустойчивости, в большинстве своем, адаптивны. С целью подтвердить адаптивное значение происходящих под влиянием низкой температуры структурных перестроек, мы систематизировали литературные данные, касающиеся наиболее часто регистрируемых физиолого-биохимических изменений в клетках и тканях холодоустойчивых растений, и сопоставили их с теми структурными трансформациями, которые обнаружили в своем исследовании (табл. 4).

Прежде всего, растения в условиях охлаждения подвергаются риску дегидратации из-за сниженного поглощения воды корнями и закрытия устьиц. Поэтому в клетках холодоустойчивых растений происходит перераспределение воды — она транспортируется из вакуоли в цитоплазму и межклеточное пространство [20]. Одновременно в клетке активируется синтез белков, липидов, моносахаров, низкомолекулярных антиоксидантов и ферментов, которые локализуются в цитоплазме [4]. Эти вещества, с одной стороны, увеличивают осмотическое давление клеточного сока, предотвращая потери клетки от дегидратации, а с другой стороны, защищают мембраны клетки от окислительного стресса и служат резервными веществами, необходимыми для поддержания роста в условиях охлаждения [20]. Визуальным отражением перечисленных физиологических и биохимических процессов являются увеличение объема цитоплазмы и ее электронной плотности, образование в ней многочисленных везикул. Везикуляция — образование мембранных пузырьков в цитоплазме, часто рядом с плазмалеммой, является структурным отражением усиленного транспорта синтезированных защитных веществ между органеллами

Таблица 4. Взаимосвязь физиолого-биохимических и структурных изменений в клетках холодостойких растений под влиянием низких температур

Физиолого-биохимические изменения и их значение	Структурные изменения
Снижение абсорбции воды корнями, закрытие устьиц, перераспределение воды в клетках, направленное на предотвращение рисков дегидратации и образования внутриклеточного льда	Увеличение площади цитоплазмы, уменьшение размеров вакуоли
Синтез и аккумуляция в цитоплазме белков, липидов, углеводов, антиоксидантов и экзимонов; усиление транспорта этих защитных веществ между органеллами клетки	Увеличение электронной плотности цитоплазмы, появление в ней многочисленных везикул
Снижение интенсивности фотосинтеза, дыхания, обмена веществ и всех основных физиологических процессов в растительных клетках и, как следствие, компенсаторное увеличение числа органелл, и контактов между ними	Увеличение числа органелл, полиморфизм митохондрий, скопления митохондрий и пероксисом около хлоропластов, стромулы в хлоропластах
Усиление распада крахмала до моносахаров, синтез и аккумуляция в стромах белков, энзимов и других веществ, обладающих осмо- и криопротекторными свойствами	Увеличение размеров хлоропластов, плотности стромы, исчезновение крахмальных включений
А) Снижение вязкости мембран, интенсивности фотосинтеза, накопление АФК, и в итоге, ингибирование ФС II; Б) образование большого количества продуктов распада мембран вследствие их быстрой перестройки	А) Формирование хлоропластов с мембранной системой “светового типа”; Б) увеличение размеров и числа пластоглобул

клетки и между клетками. Есть мнение, что за счет увеличения количества везикул в цитоплазме клетка поддерживает тонус в условиях охлаждения, накапливая мембранные липидосодержащие структуры [21]. Поэтому перечисленные структурные изменения (увеличение размеров цитоплазмы, уменьшение объема вакуоли, везикуляция) – это важный криозащитный механизм, реализующийся на уровне ультраструктуры клетки (табл. 4).

Серьезные последствия низкотемпературного воздействия на растения, как правило, связаны с замедлением всех физиологических процессов – фотосинтеза, дыхания, водного обмена и обмена веществ [8, 22]. Однако у холодостойких растений в условиях охлаждения срабатывает “количественная стратегия”, когда снижение интенсивности физиологического процесса поддерживается за счет увеличения количества структур [23, 24]. Поэтому количество хлоропластов, митохондрий и пероксисом в клетках холодостойких растений, как правило, увеличивается в условиях охлаждения. Попутно отметим, что увеличение размеров самих клеток мезофилла под влиянием низкой температуры – это типичная структурная реакция, связанная с перечисленными выше структурно-функциональными изменениями [4, 10]. Как известно, пониженные температуры, ингибируя деление клеток, слабо влияют на их рост растяжением. Вследствие этого под влиянием холода формируются крупные клетки мезофилла, богатые органеллами, пролиферация которых усиливается, обеспечивая тем самым возможность поддержания основных

физиологических процессов, прежде всего фотосинтеза и дыхания [23].

Форма митохондрий считается высокодинамичным структурным показателем [24, 25]. У теплолюбивых растений изменение формы митохондрий сопровождается “высвечиванием” матрикса и исчезновением крист, что рассматривается в качестве симптома повреждения [13, 26]. У холодостойких растений, таких как *Arabidopsis* или озимые злаки, изменение формы митохондрий на вытянутую или гантелевидную носит обратимый характер [27]. Предполагается, что такая форма органелл способствует увеличению площади их поверхности и облегчает обмен метаболитами с цитоплазмой [24, 26, 27].

Учитывая, что охлаждение замедляет все физиологические процессы и реакции в клетках, с большой вероятностью можно предполагать адаптивное значение еще одного структурного признака. Так, считается, что скопления митохондрий и пероксисом около хлоропластов способствуют установлению более тесных контактов между органеллами [28]. Известно, что именно в пероксисомах в процессе фотодыхания происходит инактивация АФК, поэтому близость пероксисом к митохондриям и хлоропластам может быть структурной визуализацией процесса усиленной защиты их мембран от окислительного стресса [28].

Еще одно интересное явление, характерное для хлоропластов холодостойких растений в условиях действия низких температур – появление в них стромул, то есть выростов, заполненных стро-

мой. Считается, что выросты увеличивают поверхность хлоропластов, связывают их между собой, способствуя более интенсивному транспорту метаболитов и сигнальных молекул между пластидами, цитоплазмой и другими органеллами клетки [29, 30]. Одной из возможных причин выростов и инвагинаций хлоропластов могут также являться изменения актинового и тубулинового цитоскелета, наблюдаемые при охлаждении [22]. Например, Holzinger с соавт. [29] показали, что плотная сеть микротрубочек в клетках мезофилла *Arabidopsis* принимает участие в образовании и функционировании выростов в хлоропластах, которые необходимы для адаптации ФСА к стрессам.

Наиболее интенсивные изменения под влиянием низкой температуры касались ультраструктуры хлоропластов. Их “округление” и потеря линзовидной формы, с одной стороны, связаны с поступлением в строму воды из цитоплазмы, замедлением оттока ассимилятов из хлоропласта и общим ингибированием флэзного потока под влиянием низких температур [13, 20]. С другой стороны, у холодостойких растений этот признак также связывают с накоплением в строме веществ с криопротекторными функциями [13]. Как правило, увеличение размеров хлоропластов у озимых злаков сопровождается гидролизом крахмальных зерен до моносахаров [4, 13] и синтезом *de novo* совместимых осмолитов — моносахаров, аминокислот, белков и др. [22]. Растворимые осмолиты, такие как глюкоза, пролин, глицинбетаин, накапливаясь в строме, не только снижают ее водный потенциал, предотвращая дегидратацию тканей, но и выступают в качестве “криопротекторов”, защищающих от инактивации белки, а липиды мембран от перекисидации [4].

Кроме того, снижение интенсивности фотосинтеза и связанные с ним риски развития окислительного стресса в условиях охлаждения приводят к необходимости структурной перестройки тилакоидных мембран в хлоропластах. Структурные изменения мембранной системы хлоропластов холодостойких растений, возникающие под влиянием низкой температуры, свидетельствуют об интенсивных процессах направленных на защиту компонентов ФС II, наиболее чувствительной к фотоингибированию [31]. Как известно, ФС II в основном локализована в мембранах гран, в то время как более устойчивая ФС I преобладает в мембранах тилакоидов, граничащих со стромой [31, 32]. Под влиянием низких температур в листьях холодостойких растений формируются хлоропласты со сниженной гранальностью, то есть хлоропласты “светового типа” [32, 33]. В них преобладают мелкие граны, содержащие небольшое число тилакоидов, причем мембраны тилакоидов стромы в таких пластидах преобладают над мембранами тилакоидов гран [34]. Подобного рода перестройка, скорее всего, отражает перераспре-

деление фотосистем в мембранах тилакоидов, направленное на дополнительную защиту ФС II от фотоингибирования. Кроме того, изменение биохимической композиции мембран, связанное с увеличением соотношения липиды/белки, ненасыщенные/насыщенные жирные кислоты, также обеспечивает холодостойкость растений [35]. Отметим, что мембраны тилакоидов гран по своей биохимической композиции менее приспособлены к охлаждению, поскольку имеют большую плотность упаковки липидов, а также содержат почти в два раза больше белков по отношению к липидам, чем мембраны тилакоидов стромы [36]. Таким образом, мембраны гран имеют более жесткую структуру, а мембраны стромы — более лабильную, и, следовательно, более приспособленную к реакциям на действие холода. Перераспределение мембран гранальных и стромальных тилакоидов в хлоропласте под влиянием низких температур имеет решающее значение, и наравне с биохимической их трансформацией, определяет устойчивость растений к холоду.

Еще один структурный признак холодоустойчивых растений в условиях охлаждения — расширение межтилакоидного пространства (люмена), является осмотической реакцией на усиление трансмембранного градиента ионов и увеличение концентрации ионов Ca^{2+} и Cl^- в люмене [31], а также связан с усилением транспорта органических кислот и энзимов, важных для процесса фотосинтеза, из люмена в строму и обратно [31, 37]. Известно, что при фотоингибировании, вызванным генерацией АФК и последующим развитием окислительного стресса, тормозится синтез *de novo* белка D1 — ключевого элемента репарации ФС II [9]. Поврежденные единицы протеина D1 мигрируют из мембран гран в мембраны тилакоидов стромы, где происходит их деградация и замена на новые копии [31]. Расширение люмена способствует диффузии люменальных протеаз к местам репарации протеина D1, и, по сути, является структурной визуализацией основного молекулярного механизма защиты ФС II от окислительного стресса.

Как правило, отмеченная выше перестройка мембранной системы хлоропластов сопровождается увеличением количества и размеров пластоглобул. Вероятно, это связано с тем обстоятельством, что освобождающиеся при перестройке системы тилакоидных мембран белки и липиды накапливаются именно в пластоглобулах, размер и количество которых, соответственно, возрастают. По этой причине увеличение пластоглобул считают неспецифическим признаком, связанным с перестройкой мембранной системы хлоропластов в любых стрессовых условиях [13, 38].

Таким образом, ультраструктурная реорганизация клеток мезофилла у озимых злаков является

одним из важнейших звеньев, необходимых для реализации стратегии, позволяющей им существовать в изменяющихся условиях среды. Основными задачами такой адаптивной структурной реорганизации клеток в условиях охлаждения являются поддержание интенсивности физиологических процессов, ингибированных низкой температурой, а также защита клеток и тканей от дегидратации и окислительного стресса, являющихся основными причинами гибели растений от холода. У холодоустойчивых растений, и в частности у озимых злаков, под влиянием низких субповреждающих температур срабатывает единая адаптивная стратегия структурной, метаболической и физиолого-биохимической реорганизации клеток и тканей, которая сводит к минимуму риски холодового стресса, позволяя растениям длительно функционировать в условиях охлаждения.

Авторы выражают благодарность Астаховой Н. В. и Поспеловой В. Н. за помощь и участие в работе по фиксации образцов, получению срезов листа и фотоснимков клеток в электронном микроскопе.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700044-6).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen L.-J., Xiang H.-Z., Miao Y., Zhang L., Guo Z.-F., Zhao X.-H., Lin J.-W., Li T.-L. An overview of cold resistance in plants // *J. Agr. Crop. Sci.* 2014. V. 200. P. 237. <https://doi.org/10.1111/jac.12082>
2. Ding Y., Shi Y., Yang S. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants // *New Phytol.* 2019. V. 222. P. 1690. <https://doi.org/10.1111/nph.15696>
3. Ritonga F.N., Chen S. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants // *Plants.* 2020. V. 9. P. 560. <https://doi.org/10.3390/plants9050560>
4. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
5. John R., Anjum N.A., Sopory S.K., Akram N.A., Ashraf M. Some key physiological and molecular processes of cold acclimation // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 603. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0648-9>
6. Deryabin A.N., Trunova T.I. Colligative effects of solutions of low-molecular sugars and their role in plants under hypothermia // *Biol. Bull.* 2021. V. 48. P. 29. <https://doi.org/10.1134/S1062359021060042>
7. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // *Вестник РАН.* 2005. Т. 75. С. 338.
8. Theocharis A., Clement Ch., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperature // *Planta.* 2012. V. 235. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
9. Kreslavski V.D., Los D. A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.I. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
10. 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.* 1997. V. 44. P. 759.
11. Astakhova N.V., Popov V.N., Selivanov A.A., Burakhanova E.A., Alieva G.P., Moshkov I.E. Reorganization of chloroplast ultrastructure associated with low-temperature hardening of *Arabidopsis* plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 744. <https://doi.org/10.1134/S102144371406003X>
12. Popov V.N., Astakhova N.V. Ultrastructural changes in chloroplasts of *Cucumis sativus* L. and *Secale cereale* L. during low-temperature hardening // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 678. <https://doi.org/10.1134/S1021443721040130>
13. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // *Plant Cell Environ.* 2002. V. 23. P. 337. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00560.x>
14. Тумов А.Ф., Акимова Т.Б., Таланова В.В., Топчиева Л.Б. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. Москва: Наука, 2006. 143 с.
15. Venzhik Yu.V., Talanova V.V., Ignatenko A.A., Repkina N.S., Kholoptseva E.S., Titov A.F. Features of wheat adaptation to frost under low-temperature exposure of different intensity // *Russ. J. Plant Phys.* 2022. V. 69. P. 105. <https://doi.org/10.1134/S1021443722040173>
16. Sabatini D.D., Bensch K., Barrnett R.J. Cytochemistry and electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 19. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.19>
17. Hepburn H.A., Naylor R.E.L., Stokes D.T. Electrolyte leakage from winter barley tissue as an indicator of winter-hardiness // *Ann. Appl. Biol.* 1986. V. 108. P. 164. <https://doi.org/10.1111/aab.1986.108.s1.164>
18. Liu X., Zhou Yu., Xiao J., Bao F. Effects of chilling on the structure, function and development of chloroplasts // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01715>
19. Bilyavska N.O., Fediuk O.M., Zolotareva E.K. Chloroplasts of cold-tolerant plants // *Plant Sci. Today.* 2019. V. 6. P. 407. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.4.584>
20. Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardeström P., Stitt M. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 1387. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1387>
21. Yamazaki T., Kawamura Yu., Uemura M. Cryobehavior of the plasma membrane in protoplasts isolated from cold-acclimated *Arabidopsis* leaves is related to surface area regulation // *Plant Cell Physiol.* 2008. V. 49. P. 944. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn068>

22. Ruelland E., Zachowsky A. How plant sense temperature // Environ. Exp. Bot. 2010. V. 69. P. 225. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.011>
23. Мировославов Е.А. Структурная адаптация растений к холодному климату // Ботанический журнал. 1994. Т. 79. С. 20.
24. Armstrong A.F., Logan D.C., Tobin A.K., O'Toole P., Atkin O.K. Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves // Plant Cell Environ. 2006. V. 29. P. 940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01475.x>
25. Logan D.C., Leaver C.J. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 865. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.346.865>
26. Ishikawa H.A. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suppression-cultured mung bean cells // Am. J. Bot. 1996. V. 83. P. 825.
27. Vella N.G.F., Joss T.V., Roberts Th.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>
28. Giełwanowska I., Pastorczyk M., Kellmann-Sopyła W., Górniak D., Górecki R.J. Morphological and ultrastructural changes of organelles in leaf mesophyll cells of the arctic and antarctic plants of *Poaceae* family under cold influence // Arct. Antarct. Alp. Res. 2015. V. 47. P. 17. <https://doi.org/10.1657/AAAR0014-019>
29. Holzinger A., Wasteneys G.O., Lütz C. Investigating cytoskeletal function in chloroplast protrusion formation in the arctic-alpine plant *Oxyria digyna* // Plant Biol. 2007. V. 9. P. 400. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924727>
30. Gray C.G., Hansen M.R., Shau D.J., Graham K., Dale R., Natesan S.K.A., Newell C.A. Plastid stromules are induced by stress treatments acting through abscisic acid // Plant J. 2012. V. 69. P. 387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04800.x>
31. 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>
32. Suorsa M., Rantala M., Mamedov F., Lespinasse M., Trotta A., Grieco M., Vuorio E., Tikkanen M., Järvi S., Aro E.-M. Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment-protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains // Plant J. 2015. V. 84. P. 360. <https://doi.org/10.1111/tpj.13004>
33. Venzhik Yu.V., Shchyogolev S.Yu., Dykman L.A. Ultrastructural reorganization of chloroplasts during plant adaptation to abiotic stress factors // Russ. J. Plant Phys. 2019. V. 66. P. 850. <https://doi.org/10.1134/S102144371906013X>
34. Anderson J.M. Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective // Aust. J. Plant Physiol. 1999. V. 26. P. 325. <https://doi.org/10.1071/PP99070>
35. Uemura M., Tominaga Y., Nakagawara Ch., Shigematsu S., Minami A., Kowamura Y. Responses of the plasma membrane to low temperature // Physiol. Plant. 2006. V. 126. P. 81. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00594.x>
36. Yeagle P.L. Membrane fusion intermediates // Curr. Top. Membr. 1997. V. 44. P. 375. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60214-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60214-2)
37. 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 (mungbean) and -insensitive (pea) seedlings // BBAS. 1990. V. 31. P. 263.
38. Arzac M.I., Fernández-Marín B., García-Plazaola J.I. More than just lipid balls: quantitative analysis of plastoglobule attributes and their stress-related responses // Planta. 2022. V. 255. P. 62. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03848-9>