

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 576.311.34:582.661.15

ВПЛИВ ВУГЛЕКИСЛОГО ГАЗУ НА СТРУКТУРУ ІЗОЛЬОВАНИХ ХЛОРОПЛАСТІВ ШПИНАТУ

© 2017 р. М. В. Водка, О. В. Поліщук,
Н. О. Білявська, О. К. Золотарьова

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Методом трансмісійної електронної мікроскопії вивчали вплив 15 хв інкубації в атмосфері з різним вмістом CO_2 або N_2 на ультраструктуру ізольованих хлоропластів шпинату. При цьому спостерігалися зміни у будові гран, неоднорідність упаковки тилакоїдів в гранах, що виявлялося у збільшенні люмінальних проміжків і товщини гранальних тилакоїдів порівняно з контролем. Найбільші зміни ультраструктурної будови були зареєстровані при продуванні суспензії ізольованих хлоропластів повітрям з підвищеним вмістом CO_2 (950 ppm). Дані свідчать про те, що підвищені концентрації CO_2 негативно впливають на фотосинтетичний апарат, порушуючи мембранну систему хлоропластів та можуть вказувати на структурну роль карбоангідразозалежної рівноваги $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ у динамічних змінах мембранної системи хлоропласта.

Ключові слова: *Spinacia oleracea*, грана, ізольований хлоропласт, карбоангідраза, люмін, підвищена концентрація CO_2 , тилакоїд

Глобальні зміни клімату пов'язують із економічною активністю людства і з техногенним забрудненням атмосфери. Одним з найважливіших чинників, що зумовлює зміни клімату, є зростання вмісту в атмосфері парникових газів, зокрема вуглекислого газу. Здатність молекул CO_2 поглинати довгохвильове (інфрачервоне) випромінювання Землі у широкому діапазоні хвиль сприяє розігріву атмосфери і є одним з факторів, що створюють парниковий ефект (Ермолаев и др., 2007). Таким чином, збільшення концентрації вуглекислоти в атмосфері призводить до підвищення температури біля земної поверхні.

Вплив підвищеної концентрації атмосферного вуглецю привертає увагу багатьох дослідників. Особливе значення мають дослідження реакцій рослин на такі зміни CO_2 , які вивчаються на рівні екосистем, популяцій, видів, організмів, тканин, а також на фізіологічному, біохімічному та молекулярному рівнях

(Woodward et al., 1991; Cheng et al., 1998; Norby et al., 1999; Ferris et al., 2001; Teng et al., 2006; Velikova et al., 2009; Xu et al., 2012). Першочергового значення набули експерименти з вивчення впливу підвищеного вмісту CO_2 у повітрі на перебіг фотосинтезу.

Швидкість фотохімічних реакцій в хлоропластах вищих рослин залежить від наявності в середовищі вуглекислого газу і/або аніонів вугільної кислоти (Stemler, 1997, van Rensen et al., 1999). Ця залежність, що дістала назву «бікарбонатного ефекту», досліджувалася на рівні інтактного листка, ізольованих тилакоїдів, фотосистем та реакційних центрів і пов'язана з присутністю у фотосистемі II (ФС II) щільно зв'язаного HCO_3^- , що виконує кофакторну функцію (Klimov et al., 1997; Klimov, Baranov, 2001).

Видалення CO_2 і бікарбонату з реакційного середовища в результаті тривалого продування суспензії хлоропластів інертним газом або ж при інкубації мембран у присутності форміату або інших іонів (антагоністів бікарбонату) призводить до пригнічення фотохімічної активності ФСII, яка специфічно відновлюється

Адреса для кореспонденції: Білявська Нінель Олександрівна, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Герещенківська, 2, Київ, 01601, Україна;
e-mail: nabel2@yandex.ua

після внесення в реакційне середовище бікарбонату, причому інші аніони не активують електронний транспорт в хлоропластах, звільнених від $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (Klimov, Vaganov, 2001). Фотофосфорилування також залежить від вмісту бікарбонату в середовищі і прискорюється при його підвищенні у суспензії хлоропластів (Онойко и др., 2010).

Нині локалізація міцно зв'язаного бікарбонату та його функціонально важлива кофакторна роль на акцепторному боці ФСII не викликають сумніву (Семеніхін та ін., 2016). Предметом гострої дискусії залишається участь бікарбонату в реакціях, пов'язаних із системою фотоокиснення води, і його роль у забезпеченні перенесення електронів на донорних ділянках фотосистеми II. Ряд фактів свідчить про залежність процесу фотосинтетичного розкладання води від рівня CO_2 . Вважається, що CO_2 діє, запобігаючи міграції світлозбирального комплексу від ФС II до ФС I. Це є одним з механізмів інгібування фотосинтезу за високих концентрацій діоксиду вуглецю і може обмежувати фотосинтез при вирощуванні рослин у середовищі з підвищеною концентрацією CO_2 (Гончарик и др., 2014).

Відомо, що внутрішньоклітинний транспорт вуглекислого газу у листках рослин від продихів до хлоропластів і до центрів карбоксилювання полегшується за рахунок каталітичної активності ферменту карбоангідрази (КА, карбонатгідроліаза КФ 4.2.1.1), яка прискорює оборотну гідратацію CO_2 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$).

Рослинні КА представлені в клітинах множинними молекулярними формами, які локалізуються в цитоплазмі і в стромі хлоропластів (Іванов и др., 2007). Показана наявність кількох центрів активності КА у тилакоїдах (Іванов и др., 2007), зокрема, було встановлено присутність КА в комплексі фотосистеми II (Shutova et al., 2008). Висловлено припущення (Золотарева, 2009), що тилакоїдна КА контролює пул мембранозв'язаного бікарбонату, який бере участь в регуляції фотохімічної активності хлоропластів (Vaganov et al., 2000).

Існують відомості про вплив підвищеної концентрації CO_2 на фотохімічну активність та швидкість фотосинтетичної фіксації CO_2 (Гончарик и др., 2014).

Достеменно відомо, що значні зміни в концентрації вуглекислого газу призводять до помітних перебудов структури листків та фотосинтетичного апарату рослин. Показано, що збагачення повітря вуглекислим газом спричи-

няє підвищення вмісту крохмалю в хлоропластах різних видів рослин (Cave et al., 1981; Yelle et al., 1989; Arp, 1991; Woodward et al., 1991; Kutik et al., 1995; Baoyu et al., 1996; Utriainen et al., 2000; Griffin et al., 2001; Teng et al., 2006; Zhang et al., 2012; Sharma et al., 2014). Набрякання або порушення тилакоїдів, спричинюване збільшенням накопичення крохмалю за високих концентрацій CO_2 істотно варіювало залежно від терміну експозиції в CO_2 , виду рослини або стадії розвитку.

На клітинах інтактних рослин було встановлено, що підвищена концентрація CO_2 впливала на стромальні та гранальні тилакоїди хлоропластів. Griffin et al. (2001) вивчали тилакоїди у трав'янистих (*Glycine max*, *Abutilon theophrasti*) і деревних (*Piper auritum*, *Pinus radiata*, *Epipremnum pinnatum*, *Acer rubrum*, *Liquidambar styraciflua*, *Cercis canadensis*) рослин, що розвивалися за різних умов збагачення CO_2 . Відношення стромальних до гранальних тилакоїдів збільшувалося у *A. rubrum*, *C. canadensis*, *L. styraciflua* та *P. auritum*, але не у *E. pinnatum*. Відповідне збільшення співвідношення площі стромальних тилакоїдів до загальної площі хлоропласту та зниження співвідношення площі гранальних тилакоїдів до загальної площі хлоропласту також спостерігали в усіх досліджених видів за підвищених концентрацій CO_2 . Зростання відношення стромальних до гранальних тилакоїдів зі зв'язаним збільшенням центрів ФСII пояснювалося авторами як механізм підвищення здатності до ефективної фіксації CO_2 .

Досліджувався вплив високої концентрації CO_2 (1000 ppm) на ультраструктуру листків *Pfaffia glomerata* (Saldanha et al., 2014). В цій роботі показано, що хлоропласти рослин, які росли при 360 ppm, мали достатньо диференційовані стопки гран та тилакоїди строми. Однак при 1000 ppm в хлоропластах листків спостерігалось зменшення кількості гран та набрякання мембран тилакоїдів.

Показано, що частка тилакоїдів строми спочатку була низькою у пшениці та ячменю за високої концентрації CO_2 , але поступово збільшувалася, що корелювало з підвищенням активності Рубіско (Pennanen et al., 1993). В іншій роботі було виявлено, що підвищена концентрація CO_2 збільшує ступінь стиковки тилакоїдів гран у пшениці (Baoyu et al., 2002). Зміни в тилакоїдах *Setaria italica*, C_4 -рослини, під дією підвищеної концентрації CO_2 показали у стромі з великими крохмальними зернами в хлоропластах клітин обгортки судин наявність відносно

недиференційованих тилакоїдних мембран строми та гран (Baoyu et al., 1996). Однак порівняння ультраструктури листків у C_3 (*Panicum tricanthum*), C_4 (*P. antidotale*) та C_3/C_4 проміжного виду (*P. decipiens*) род. *Panicum*, які експонувалися за підвищеної концентрації CO_2 , не показало значних відмінностей у співвідношенні гранальних до стромальних тилакоїдів у хлоропластах клітин обгортки судин або мезофілу (Tipping and Murray, 1999). Так, при дослідженні клітин мезофілу *Lycopersicon esculentum* та *L. chmielewsi* після 4 та 10 тижнів експозиції за концентрації CO_2 900 ppm було виявлено незмінну ультраструктуру хлоропластів, незважаючи на помітне накопичення крохмалю після 4 тижнів обробки збагаченим CO_2 у обох видів (Yelle et al., 1989). Однак 10-тижнева експозиція у CO_2 призводила до явного порушення тилакоїдів у обох видів. Зміни регулярного розташування гран та ламел строми спостерігали у молодих клітинах *Triticum aestivum*, *T. monocoocum* та *T. dicoccoides* за підвищеного вмісту CO_2 (Sinha et al., 2009). Порушення тилакоїдів у результаті більшого накопичення крохмальних зерен також спостерігалося у клітинах мезофілу *T. aestivum* (Sharma et al., 2014).

Нами раніше було показано, що після обробки ізольованих хлоропластів шпинату іонами Cu^{2+} і Zn^{2+} , інгібіторами карбоангідрази, спостерігалася зміна будови гран, що виявлялося у збільшенні люмінальних проміжків і товщини тилакоїдів гран порівняно з контролем (Водка та ін., 2013; Водка и др., 2013). Отримані дані могли вказувати на зниження активності тилакоїдної карбоангідрази, інгібування електронного транспорту та процесу фотосинтезу в цілому в присутності інгібіторів.

Таким чином, існуючі дані дозволяють припустити, що під дією різних концентрацій CO_2 буде змінюватися активність карбоангідрази та ультраструктурна організація тилакоїдної системи ізольованих хлоропластів. Метою нашої роботи було з'ясування можливої ролі зв'язаного бікарбонату у підтриманні структури фотосинтезуючих мембран ізольованих хлоропластів.

МЕТОДИКА

Щойно зрізані листки шпинату (*Spinacia oleracea* L.) витримували у холодильнику при 4-6°C протягом 2-3 годин. Потім з листків вирізали жилки і отримані фрагменти подрібнювали у блендері в середовищі виділення наступного складу: 0,4 М сорбітол; 0,05 М трицин-NaOH (pH 7,8); 0,01 М NaCl і 0,01 М аскорбат

натрію. Аскорбат натрію готували безпосередньо перед дослідом, змішуючи еквімолярні розчини аскорбінової кислоти і гідрокарбонату натрію. Для подрібнення 100 г листків рослин використовували 300 мл середовища виділення. Отриманий гомогенат фільтрували через два шари полотна, хлоропласти осаджували при 3500 g протягом 7 хв. Потім осад ресуспендували в середовищі зберігання такого складу: 0,1 М сорбітол; 0,01 М NaCl; 0,025 М $MgCl_2$; 0,01 М трис-HCl (pH 7,8-8,0) і центрифугували протягом 1 хв. при 800 g для видалення фрагментів клітинних стінок та інших важких часток. Супернатант центрифугували протягом 7 хв. при 3500 g. Осад хлоропластів суспендували в середовищі зберігання до концентрації 4 мг хл/мл і зберігали в темряві при температурі 4°C.

Основний вид обробки препаратів полягав у продуванні повітря зі змінним складом над поверхнею суспензії хлоропластів, що інтенсивно перемішувалася. Обробка в усіх випадках тривала 15 хв при інтенсивному перемішуванні за температури 4°C у скляному бюксі об'ємом 20 мл при об'ємі препарату 2 мл. Схема досліду: 1) контроль, без продування; 2) продування повітрям, позбавленим CO_2 ; 3) продування повітрям з концентрацією CO_2 350 мкл/л; 4) продування повітрям з концентрацією CO_2 950 мкл/л; 4) продування азотом, тобто у відсутності як CO_2 , так і O_2 .

Об'ємна швидкість потоку газу при продуванні препаратів становила 400 мл/хв. Продування повітрям зі зміненою концентрацією CO_2 здійснювалось за допомогою CO_2 -газометричної установки на основі інфрачервоного газоаналізатора S-151 («Qubit systems», Канада). Вилучення CO_2 досягалось продуванням атмосферного повітря через 100 мл колонку з аскаритом. Збільшення вмісту CO_2 у газовій суміші досягалось додаванням CO_2 , який вивільнявся в реакції гідрокарбонату натрію з оцтовою кислотою. Повітря накачувалося через колонку з аскаритом у резервуар об'ємом 200 л, потім, за необхідності, додавали CO_2 , періодично перевіряючи концентрацію CO_2 в об'ємі. Продування препаратів відбувалося за постійного контролю швидкості потоку газу та концентрації CO_2 у ньому.

Для електронно-мікроскопічного дослідження ультраструктури препаратів хлоропластів В класу зі шпинату використовували концентровану суспензію після часткової дегідратації на міліпоровських фільтрах.

ВПЛИВ ВУГЛЕКИСЛОГО ГАЗУ

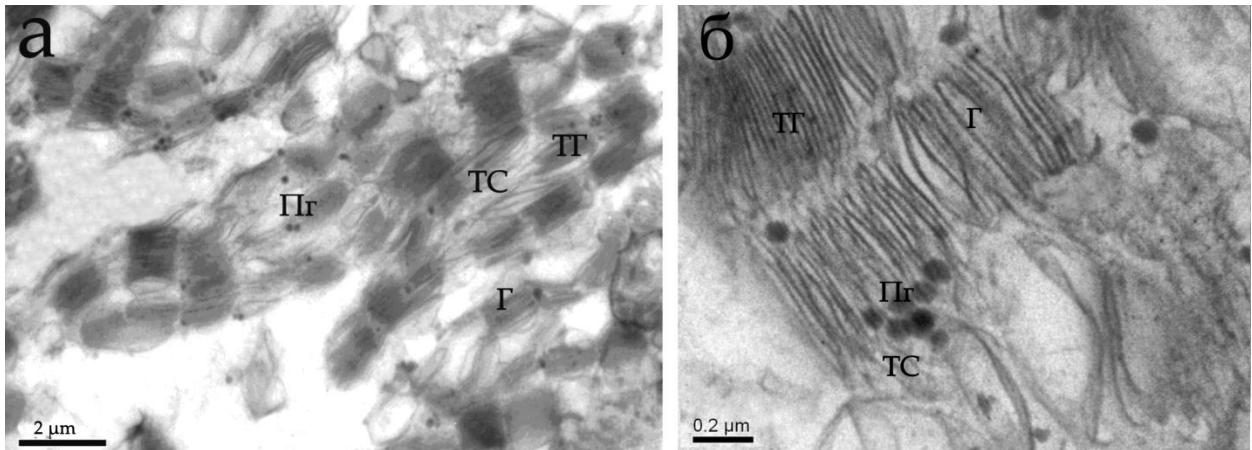


Рис. 1. Ультраструктура хлоропластів, ізольованих з листків шпинату: а – загальний вигляд, б – грана.

Тут і на рис. 2-5: Г – грана, Пг – пластоглобула, ТГ – тилакоїди грани, ТС – тилакоїди строми.

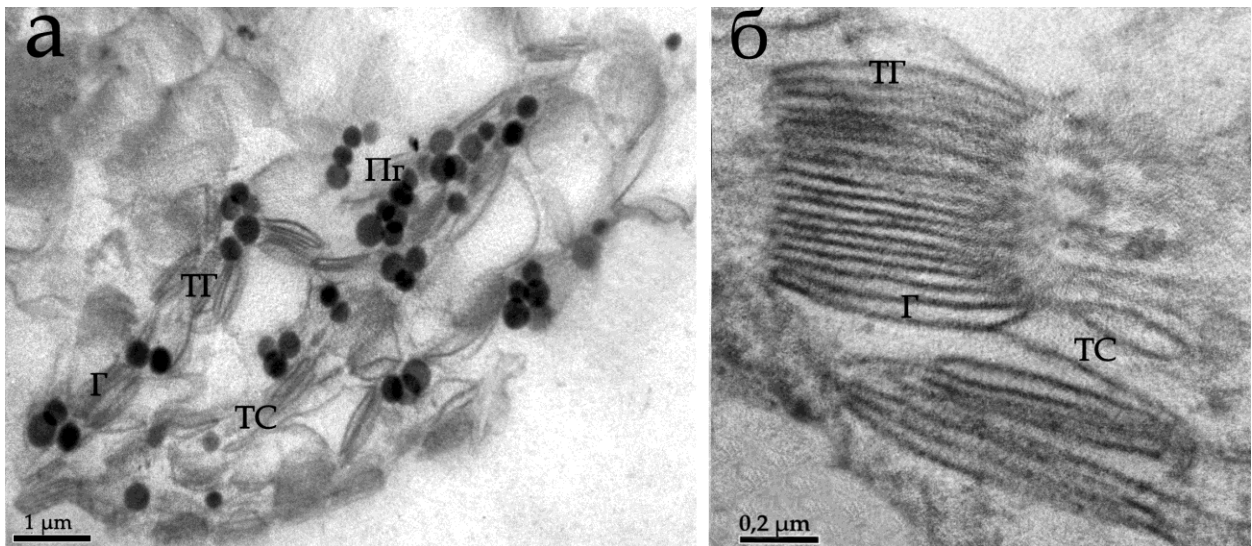


Рис. 2. Ультраструктура ізольованих хлоропластів з листків шпинату після продування N₂: а – загальний вигляд, б – грана.

Препарати суспензії хлоропластів поміщали в середину агарових блоків. Фіксацію зразків проводили 2,5% глутаровим альдегідом на 0,1 М какодилатному буфері, рН 7,8, протягом 4 год при 4°C. Після промивки у тому ж буфері (2 рази по 20 хв) здійснювали постфіксацію матеріалу розчином 1% OsO₄ на 0,1 М какодилатному буфері впродовж ночі при 4°C. Зневоднення проводили, промиваючи проби в етиловому спирті зростаючої концентрації та ацетоні. Після цього матеріал просочували у суміші епоксидних смол та ацетону, заливали у епон-аралдитну смолу. Потім блоки перенесли у термостат для полімеризації при 60°C протягом 3 дб.

Ультратонкі зрізи хлоропластів товщиною 80-100 нм виготовляли за допомогою ультрамікроскопа LKB-V (LKB, Швеція). Зрізи ко-

нструували сумішню ураніл-ацетату та перманганату калію (1:1) протягом 15 хв. у темряві. Ультратонкі зрізи досліджували у трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1300 (JEOL, Японія) при 80 кв.

Для морфометричного аналізу для кожного варіанта досліді і контролів аналізували по 30-39 фотографій із загальним збільшенням $\times 10000$, 15000 або 100000 .

Визначення розмірів елементів гран на зображеннях хлоропластів проводили за допомогою комп'ютерної програми ImageTool 3.0 (UTHSCSA, США). Обробку результатів досліджень проводили за допомогою пакета прикладних програм Microsoft Excel 7,0, BIO8, Statistica 6.0. Розраховували величини середніх і стандартних квадратичних відхилень, які не перевищували 5%. Експериментальні дані, на-

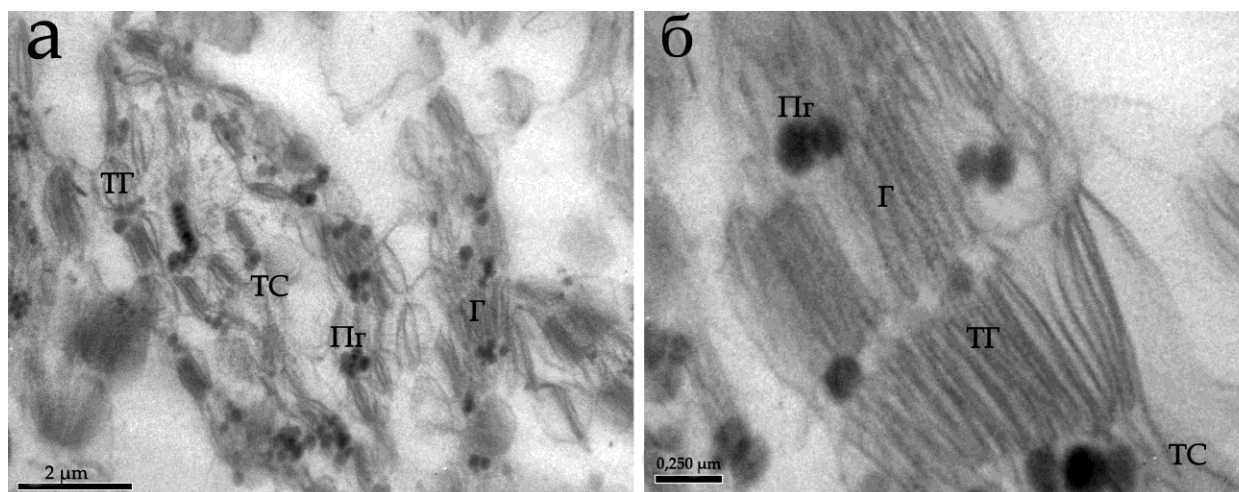


Рис. 3. Ультраструктура ізольованих хлоропластів з листків шпинату після продування повітрям без CO_2 : а – загальний вигляд, б – грана.

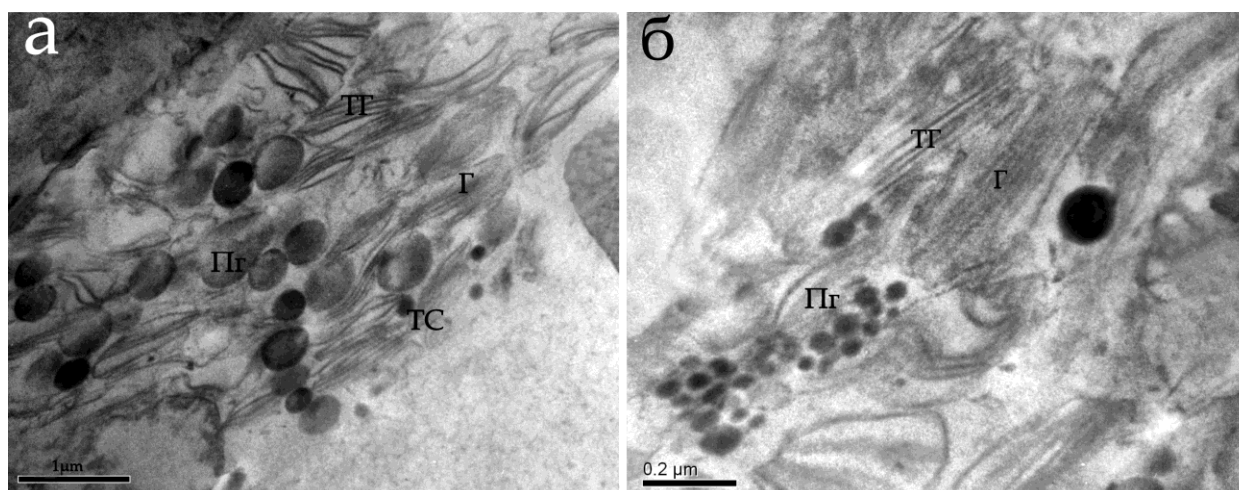


Рис. 4. Ультраструктура ізольованих хлоропластів з листків шпинату після продування повітрям, що містило 350 ppm CO_2 : а – загальний вигляд, б – грана.

ведені в таблиці, представлено у вигляді середнього арифметичного (M) зі стандартним відхиленням (m), визначеними з урахуванням усіх повторів. Досліди повторювали тричі. Достовірність різниці середніх значень між дослідними та контрольними варіантами оцінювали за допомогою t -критерію Ст'юдента (Лакин, 1990). Різницю вважали статистично достовірною при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

На рис. 1 представлено електронні мікрофотографії хлоропластів контрольного варіанта, на яких чітко вирізняються численні інтактні грана. Грана мають типову для них структуру, що складається з щільно упакованих тилакоїдів гран, від термінальних ділянок яких відходять тилакоїди строми (рис. 1). Кількість тилакоїдів у гранах значно варіює, проте перева-

жають за чисельністю грани, які містять 10 і більше тилакоїдів. Також в стромі хлоропластів зустрічаються нечисленні пластоглобули невеликого розміру, які переважно розташовуються поблизу тилакоїдів строми.

На рис. 2 представлено ізольовані хлоропласти після продування N_2 , внаслідок чого вміст CO_2 і O_2 в суспензії різко знижувався. Хлоропласти за цих умов зберігали загальну форму, але кількість тилакоїдів в гранах значно зменшувалася порівняно з контролем; при цьому тилакоїди гран мали набряклу структуру і термінальні тилакоїди гран відходили від тіла грани. Значно зростала кількість та розміри пластоглобул, причому, у більшості випадків вони утворювали групи з 2-6 включень. Параметри компонентів хлоропластів наведені в таблиці.

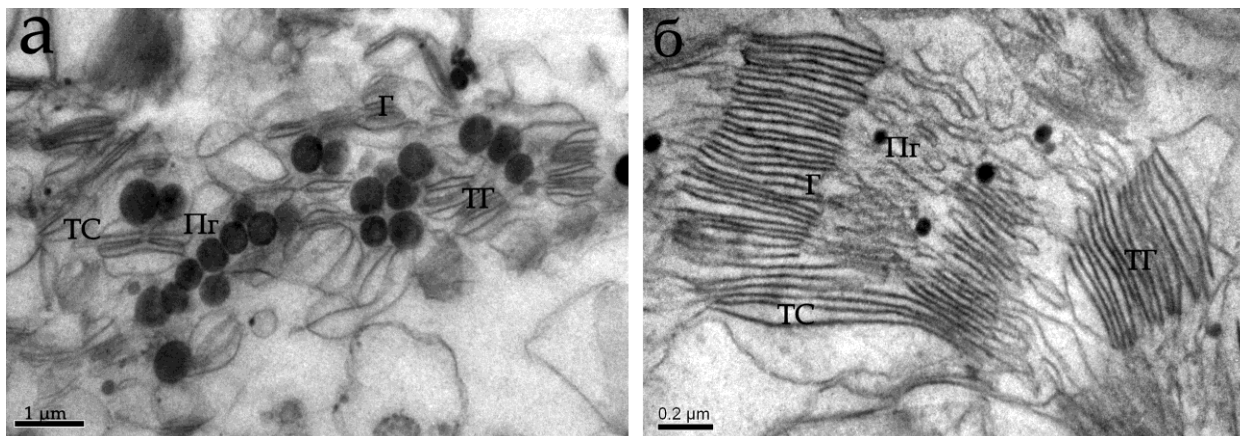


Рис. 5. Ультраструктура ізольованих хлоропластів з листків шпинату після продування повітрям, що містило 950 ppm CO₂: а – загальний вигляд, б – грана.

Вплив продування на ізольовані хлоропласти з листків шпинату

Варіант	Товщина тилакоїдів, 10 ⁻⁹ м	Ширина люмінальних проміжків, 10 ⁻⁹ м	Площа пластоглобули, 10 ⁻¹⁰ м ²
Контроль	10,62 ± 0,16	13,47 ± 0,19	7,57 ± 0,15
N ₂	13,50 ± 0,15	22,84 ± 0,21	14,25 ± 0,13
0 ppm CO ₂	11,53 ± 0,21	18,59 ± 0,11	8,07 ± 0,18
350 ppm CO ₂	14,25 ± 0,12	20,62 ± 0,15	14,76 ± 0,17
950 ppm CO ₂	15,62 ± 0,20	24,48 ± 0,25	19,22 ± 0,11

На рис. 3 наведені мікрофотографії ізольованих хлоропластів шпинату, після продування суспензії повітрям, що не містило CO₂. У даному варіанті спостерігалася варіабельність кількості тилакоїдів в гранах (від кількох до десятків), відбувалося незначне порушення пакування тилакоїдів гран, але при цьому структура тилакоїдів виглядала набряклою. Товщина тилакоїдів, як і ширина люмінальних проміжків, мала тенденцію до підвищення порівняно з контролем (таблиця). У хлоропластах відзначено присутність великої кількості пластоглобул, розмір яких ненабагато відрізнявся від такого у контролі.

На рис. 4 представлено вплив інкубації ізольованих хлоропластів шпинату при продуванні суспензії повітрям, яке містило 350 ppm CO₂. Загальна структура хлоропластів зазнавала змін, піддавалася перебудовам також гранальна система хлоропластів: спостерігалася набрякання тилакоїдів гран та часткове розходження гран внаслідок розширення люмінальних проміжків. Ширина люмінальних проміжків значимо зростала порівняно з контролем (таблиця). Помітно збільшувався розмір пластоглобул, тоді як їх кількість дещо зменшувалася.

На рис. 5 показано вплив на ізольовані хлоропласти листків шпинату продування повітрям з підвищеною концентрацією CO₂ (950 ppm). Спостерігалися зменшення кількості тилакоїдів в гранах, порушення їх пакування, а саме, відрив частини тилакоїдів від тіла гран, особливо на їх термінальних кінцях, нерівномірне і суттєве розширення люмінального простору, а також максимальне збільшення товщини тилакоїдів порівняно з контрольними зразками (таблиця). Великих розмірів пластоглобули утворювали групи або ланцюжки з 2-12 включень, які тісно контактували між собою.

Отже найбільший вплив на виділені хлоропласти листків шпинату мала продувка суспензії повітрям, яке містило 950 ppm CO₂. Ряд варіантів продування у порядку зменшення їх впливу на кількісні характеристики хлоропластів можна представити таким чином: 950 ppm CO₂ > 350 ppm CO₂ > N₂ > 0 ppm CO₂.

ОБГОВОРЕННЯ

Перш за все, важливо було з'ясувати, чи змінилася структура тилакоїдів з хлоропластів шпинату після інкубації в атмосфері інертного газу (N₂). Ми показали, що за умов видалення розчинених CO₂ і O₂ із хлоропластів спостері-

галосся збільшення товщини тилакоїдів та ширини люмінального простору порівняно з контрольними зразками (таблиця). Наші дані відрізняються від результатів досліджень хлоропластів з листків *Arabidopsis*, які піддавалися тривалій інкубації в атмосфері N_2 та яскравому освітленню ($2000 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$), що призвело до значного зменшення тилакоїдного просвіту в гранах, який у значній частині тилакоїдів досягав ширини $< 4 \text{ нм}$ (Tsabari et al., 2015). Розбіжність результатів, очевидно, можна пояснити світловими стресовими умовами, різницею об'єкта дослідження та/або видовими особливостями рослин.

Раніше проведені експерименти показали, що швидкість перенесення електронів від води до метилвіологену, а також величина трансмембранного градієнта протонів в препаратах ізольованих хлоропластів шпинату, інкубованих за наявності етоксизоламиду і ацетазоламиду, інгібіторів карбоангідрازی, в атмосфері азоту, практично не відрізнялися від цих же характеристик контрольних хлоропластів (Подорванов та ін., 2006). Однак пригнічення КА активності продуванням інертним газом негативно впливає на світлозалежне поглинання протонів. Це узгоджується з результатами наших досліджень впливу рівня КА активності на структуру тилакоїдів (Водка та ін., 2013; Водка и др., 2013; Семеніхін та ін., 2016). Оскільки розмір пулу мембранозв'язаного бікарбонату достатньо великий (Varanov et al., 2000) і приблизно відповідає молярному вмісту хлорофілу, зміна кількості або співвідношення форм вугільної кислоти, присутньої у зв'язаному стані в мембранах тилакоїдів, може призводити до структурних змін мембранної системи хлоропласта.

Видалення тільки CO_2 з атмосфери над суспензією ізольованих хлоропластів шпинату ($0 \text{ ppm } CO_2$) менше впливало на структурні характеристики гран, ніж обробка N_2 , проте призводило до набрякання тилакоїдів гран та нерівномірного розширення люмінальних проміжків (таблиця).

Слід зазначити, що підвищення концентрацій CO_2 до 350 та 950 ppm ще більшою мірою розширювало люмінальні проміжки гран тилакоїдів та збільшувало ширину останніх (таблиця). Таке розширення, як очікується, може істотно сприяти дифузії білків усередині цього компартменту. Відновний цикл ФС II включає залежне від фосфорилування розбирання $FC2/LHCII$ суперкомплексів в гранах і міграцію мономерів ФС II до стромальних ламел, де

вони далі розбираються, з подальшою деградацією субодиниць D1 (і, меншою мірою, субодиниць D2) асоційованими з тилакоїдами протеазами і супутнім введенням нових синтезованих білків, і, нарешті, повторною збіркою їх комплексів та їх повторним вбудовуванням в мембрани гран (Yamamoto et al., 2008; Kato, Sakamoto, 2009; Komenda et al., 2012). Вважається, що додаткове розширення люмінів гранальних тилакоїдів збільшує доступність пошкоджених комплексів ФС II до дії протеаз, присутніх в просвіті на краях гран (Degl і Deg5/8), що дозволяє швидше обробляти D1/D2 (Kirchhoff et al., 2011).

Зміна властивостей мембран під час відновного циклу ФС II узгоджується з результатами, що показують залежне від фосфорилування збільшення рухливості $FC2/LHCII$ в мембранах гран протягом цієї фази (Fristedt et al., 2009; Goral et al., 2010; Herbstová et al., 2012). Фосфорилування $FC2$ та $LHCII$ білків під час відновлення ФС II також могло призвести до локального відходження мембран від краю грани (Tikkanen et al., 2008; Herbstová et al., 2012), як це спостерігалось і у наших експериментах. Крім сприяння перенесенню $FC2$ для відновлення в стромальні ламели, така відстиковка вважається необхідною для доступу асоційованої з тилакоїдами протеази, FtsH, та фосфатази стромальних $FC2$, PSCP, до деформованих D1 білків в гранах (Puthiyaveetil et al., 2014; Yoshioka-Nishimura et al., 2014).

Результати структурних досліджень дозволяють припустити, що зміна кінетичних характеристик фотохімічних процесів у хлоропластах в присутності підвищеної концентрації CO_2 , яка спостерігалась раніше (Гончарик и др., 2014), може бути наслідком саме перебування мембранної системи хлоропластів (набрякання тилакоїдних мембран та зміни структури тилакоїдів). Слід зазначити, що вплив підвищеної концентрації CO_2 на структуру гранальної системи виявився найбільш вираженим.

Протягом еволюційного розвитку рослин відбувалося їх пристосування до змін умов зростання, і в фотосинтетичному апараті сформувалася велика кількість адаптаційних механізмів. При збудженні електрон-транспортного ланцюга рослини не здатні використовувати всю отриману енергію в фотохімічних реакціях, що призводить до підвищення продукції активних форм кисню (АФК). За таких умов рослини здатні активувати нефотохімічне гасіння надлишкової енергії збудження (Puthiyaveetil et al., 2014).

Найбільш поширеною реакцією в хлоропластах на дію різних чинників, зокрема і підвищених концентрацій CO₂, є збільшення кількості та розмірів пластоглобул, як це спостерігалось і у наших зразках. Такий же феномен виявлено у хлоропластах клітин в листках *Beta vulgaris* за підвищеного вмісту CO₂ (Kutik et al., 1995). Ультраструктурний аналіз повністю розтягнутих листків *Impatiens hawkeri* показав збільшення числа пластоглобул при збагаченні CO₂ (Zhang et al., 2012). Однак Oksanen et al. (2001) виявили зменшення пластоглобул в листках *Populus tremuloides*, експонованих при підвищеній концентрації CO₂. Точний механізм змін пластоглобул у відповідь на підвищення вмісту CO₂ поки що невідомий. Однак збагачення пластоглобулами корелює з високими рівнями пластоглобулінових білків та підвищеною продукцією антиоксидантних молекул, таких як токоферолі (Bréhélin et al., 2007).

Пластоглобули є запасуючими ліпіди та каротиноїди тільцями, які беруть участь у розвитку та розбиранні тилакоїдів (Bréhélin et al., 2007). Вважають, що вони відіграють активну роль у різних метаболічних та стрес-регульованих шляхах (Rottet et al., 2015; 2016). Як відомо, пластоглобули ззовні оточені полярним ліпідним моношаром, який сполучається із зовнішнім ліпідним листком тилакоїдів (Austin, 2006; Brehelin, Kessler, 2008). Поверхня пластоглобул усяна білками, серед яких є фібриліни (пластоглобуліни), які вважаються структурними білками, що, очевидно, беруть участь у метаболізмі ліпідів (Bréhélin, Kessler, 2008). Середина пластоглобул складається з нейтральних ліпідів – токоферолу, філохінону, каротиноїдів, фітинових ефірів жирних кислот, триацилгліцеринів та ін. (Spicher, Kessler, 2015). Кількість, розмір та вміст ліпідів змінюються залежно від умов середовища та стадії розвитку рослини (Besagni, Kessler, 2013). Високі концентрації CO₂ можуть провокувати виникнення окиснювального стресу, серед проявів якого окиснення ліпідів є особливо небезпечним, оскільки через так звані «ланцюгові реакції» в результаті утворюються вільні радикали (Demidchik, 2014). Окиснення ліпідів (також відоме як пероксидне окиснення ліпідів, ПОЛ) розглядається як одна з головних ознак окиснювального стресу (Farmer, Mueller, 2013).

Отже, інкубація ізольованих хлоропластів шпинату в атмосфері з підвищеною концентрацією CO₂ викликала деякі модифікації в структурі гран, які можна класифікувати як вплив помірного ступеня. Це може розглядати-

ся як один з механізмів інгібування фотосинтезу при високих концентраціях діоксиду вуглецю, що обмежує фотосинтез при вирощуванні рослин в середовищі з підвищеною концентрацією CO₂

Таким чином, проведені дослідження виявили вплив підвищеного вмісту CO₂ на структуру ізольованих хлоропластів шпинату. Отримані дані можуть вказувати на структурну роль карбоангідрозалежної рівноваги CO₂/HCO₃⁻ у динамічних змінах мембранної системи хлоропласту.

ЛІТЕРАТУРА

- Водка М.В., Полищук О.В., Білявська Н.О., Золотарьова О.К. Реакція фотосинтетичного апарату шпинату на дію важких металів, інгібіторів карбоангідрози // Доповіді НАН України. – 2013. – № 10. – С. 152-158.
- Водка М.В., Полищук А.В., Белявская Н.А., Золотарёва Е.К. Воздействие тяжелых металлов, ингибиторов карбоангидразы, на мембранную систему хлоропластов листьев гороха // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 3 (30). – С. 46-55.
- Гончарик Р.Г., Доманский В.П., Козел Н.В. Влияние CO₂ в высоких концентрациях на электронный транспорт в фотосистеме 2 // Весці НАН Беларусі. – 2014. – № 3. – С. 38-41.
- Ермолаев В.С., Иночкин М.В., Пузык И.П., Пузык М.В. Парниковый эффект: диоксид углерода и антропогенный фактор // Общество. Среда. Развитие (Тerra Humana). – 2007. – № 2. – С. 77-82.
- Золотарева Е.К.. Участие связанного бикарбоната в фотосинтетическом протонном транспорте. // Фізіологія рослин: Проблеми та перспективи розвитку. – К.: Логос, 2009. – Т. 1. – С. 91-112.
- Иванов Б.Н., Игнатова Л.К., Романова А.К.. Разнообразие форм и функций карбоангидразы высших наземных растений // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 165-185.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
- Онойко Е.Б., Полищук А.В., Золотарева Е.К. Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы // Доповіді НАН України. – 2010. – № 10. – С. 160-165.
- Подорванов В.В., Золотарьова О.К., Черноштан О.А. Участь бикарбоната в регуляції фотохімічних реакцій в хлоропластах шпинату // Укр. фітоценол. збірник. – К., 2006. – С. 18-25.
- Семенухин А.В., Полищук А.В., Подорванов В.В. Влияние ионов тяжелых металлов на активность карбоангидразы хлоропластов гороха // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2014. – Вип. 2 (32). – С. 23-31.

- Семеніхін А.В., Водка М.В., Поліщук О.В.* Кофакторна та структурна роль CO₂ у хлоропластах // Укр. ботан. журн. – 2016. – Т. 73. – С. 290-297.
- Arp W.J.* Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂ // *Plant Cell Environ.* – 1991. – V. 14. – P. 869-875.
- Austin J. R., Frost E., Vidi P. A., Kessler F., Staehelin L.A.* Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes // *Plant Cell.* – 2006. – V. 18. – P. 1693-1703.
- Baoyu Z., Guizhen J., Kezhi B., Tingyun K.* Effect of doubled CO₂ concentration on the ultrastructure of chloroplasts from *Medicago sativa* and *Setaria italica* // *Acta Bot. Sin.* – 1996. – V. 38. – P. 72-76.
- Baoyu Z., Quan Z., Gui-zhen J., Zhi B., Tingyun K.* Effects of doubled CO₂ concentration on ultrastructure, supramolecular architecture and spectral characteristics of chloroplasts from wheat // *Acta Bot. Sin.* – 2002. – V. 44. – P. 908-912.
- Baranov S.V., Ananyev G.M., Klimov V.V., Dismukes G.C.* Bicarbonate accelerates assembly of the inorganic core of the water-oxidizing complex in manganese-depleted Photosystem II: A proposed biogeochemical role for atmospheric carbon dioxide in oxygenic photosynthesis // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 6060-6065.
- Besagni C., Kessler F.* A mechanism implicating plastoglobules in thylakoid disassembly during senescence and nitrogen starvation // *Planta.* – 2013. – V. 237. – P. 463-470.
- Bréhélin C., Kessler F.* The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks // *Photochem. Photobiol.* – 2008. – V. 84. – P. 1388-1394.
- Bréhélin C., Kessler F., van Wijk K.J.* Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids // *Trends Plant. Sci.* – 2007. – V. 12. – P. 260-266.
- Cave G., Tolley L.C., Strain B.R.* Effect of carbon dioxide enrichment on chlorophyll content, starch content and starch grain structure in *Trifolium subterraneum* leaves // *Physiol. Plant.* – 1981. – V. 51. – P. 171-174.
- Cheng S.H., Moore B.D., Seemann J.R.* Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 116. – P. 715-723.
- Demidchik V.* Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells // *J. Plant Physiol.* – 2014. – V. 171. – P. 696-707.
- Farmer E. E., Mueller M. J.* ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2013. – V. 64. – P. 429-450.
- Ferris R., Sabatti M., Miglietta F., Mills R.F., Taylor G.* Leaf area is stimulated in *Populus* by free air CO₂ enrichment (POPFACE), through increased cell expansion and production // *Plant Cell Environ.* – 2001. – V. 24. – P. 305-315.
- Fristedt, R., Willig, A., Granath, P., Crevecoeur, M., Rochaix, J.D., Vener, A.V.* Phosphorylation of photosystem II controls functional macroscopic folding of photosynthetic membranes in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2009. – V. 21. – P. 3950-3964.
- Goral T.K., Johnson M.P., Brain A.P., Kirchhoff H., Ruban A.V., Mullineaux C.W.* Visualizing the mobility and distribution of chlorophyll proteins in higher plant thylakoid membranes: effects of photoinhibition and protein phosphorylation // *Plant J.* – 2010. – V. 62. – P. 948-959.
- Griffin K.L., Anderson O.R., Gastrich M.D., Lewis J.D., Lin G., Schuster W., Seemann J.R., Tissue D.T., Turnbull M.H., Whitehead D.* Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2001. – V. 98. – P. 2473-2478.
- Herbstová M., Tietz S., Kinzel C., Turkina M.V., Kirchhoff H.* Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – P. 20130-20135.
- Kato Y., Sakamoto W.* Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle // *J. Biochem.* – 2009. – V. 146. – P. 463-469.
- Kirchhoff H., Hall C., Wood M., Herbstová M., Tsabari O., Nevo R., Charuvi D., Shimoni E., Reich Z.* Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. – P. 20248-20253.
- Klimov V.V., Baranov S.V.* Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – V. 1503. – P. 187-196.
- Klimov V.V., Hulsebosch R.J., Allakhverdiev S.I., Wincencjusz H., van Gorkom H.J., Hoff A.J.* Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of Photosystem II // *Biochemistry.* – 1997. – V. 36. – P. 16277-16281.
- Komenda J., Sobotka R., Nixon P.J.* Assembling and maintaining the photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2012. – V. 15. – P. 245-251.
- Kutik J., Nátr L., Demmers-Derks H.H., Lawlor D.W.* Chloroplast ultrastructure of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivated in normal and elevated CO₂ concentrations with two contrasted nitrogen supplies // *J. Exp. Bot.* – 1995. – V. 46. – P. 1797-1802.
- Norby R.J., Wullschleger S.D., Gunderson C.A., Johnson D.W., Ceulemans R.* Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest // *Plant Cell Environ.* – 1999. – V. 22. – P. 683-714.

- Oksanen E., Sober J., Karnosky D.F.* Impacts of elevated CO₂ and/or O₃ on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the aspen FACE experiment // *Environ. Pollut.* – 2001. – V. 115. – P. 437-446.
- Pennanen A., Kemppi V., Lawlor D., Pehu E.* Effects of elevated CO₂ on photosynthesis, biomass production and chloroplast thylakoid structure of crop plants // *Curr. Topics Plant Physiol.* – 1993. – V. 8. – P. 185-192.
- Puthiyaveetil S., Tsabari S., Lowry T., Lenhart S., Lewis R.R., Reich Z., Kirchoff H.* Compartmentalization of the protein repair machinery in photosynthetic membranes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2014. – V. 111. – P. 15839-15844.
- Rottet S., Besagni C., Kessler F.* The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – V. 1847. – P. 889-899.
- Rottet S., Devillers J., Glauser G., Douet V., Besagni C., Kessler F.* Identification of plastoglobules as a site of carotenoid cleavage // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7:1855.
- Saldanha C.W., Otoni C.G., Rocha D.I., Cavatte P.C., Detmann K.D.S.C., Tanaka F.A.O., Dias L.L.C., DaMatta F.M., Otoni W.C.* CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederesen] plantlets // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2014. – V. 118. – P. 87-99.
- Sharma N., Sinha P.G., Bhatnagar A.K.* Effect of elevated [CO₂] on cell structure and function in seed plants // *Climate Change Envir. Sustain.* – 2014. – V. 2. – P. 69-104.
- Shutova T., Kenneweg H., Buchta J., Nikitina J., Terentyev V., Chernyshov S., Andersson B., Allakhverdiev S. I., Klimov V. V., Dau H., Junge W., Samuelsson G.* The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal // *EMBO J.* – 2008. – V. 27. – P. 782-791.
- Sinha P.G., Kapoor R., Uprety D.C., Bhatnagar A.K.* Impact of elevated CO₂ concentration on ultrastructure of pericarp and composition of grain in three *Triticum* species of different ploidy levels // *Environ. Exp. Bot.* – 2009. – V. 66. – P. 451-456.
- Spicher L., Kessler F.* Unexpected roles of plastoglobules (plastid lipid droplets) in vitamin K 1 and E metabolism // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2015. – V. 25. – P. 123-129.
- Stemler A. J.* The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase // *Physiol. Plant.* – 1997. – V. 99. – P. 348-353.
- Teng N., Wang J., Chen T., Wu X., Wang Y., Lin J.* Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* – 2006. – V. 172. – P. 92-103.
- Tikkanen M., Nurmi M., Suorsa M., Danielsson R., Mamedov F., Styring S., Aro, E.M.* Phosphorylation-dependent regulation of excitation energy distribution between the two photosystems in higher plants // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777. – P. 425-432.
- Tipping C., Murray D.R.* Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on leaf anatomy and morphology in *Panicum* species representing different photosynthetic modes // *Int. J. Plant Sci.* – 1999. – V. 160. – P. 1063-1073
- Tsabari O., Nevo R., Meir S., Carrillo L. R., Kramer D.M., Reich Z.* Differential effects of ambient or diminished CO₂ and O₂ levels on thylakoid membrane structure in light-stressed plants // *Plant J.* – 2015. – V. 81. – P. 884-894.
- Utriainen J., Janhunen S., Helmisaari H.S., Holopainen T.* Biomass allocation, needle structural characteristics and nutrient composition in Scots pine seedlings exposed to elevated CO₂ and O₃ concentrations // *Trees.* – 2000. – V. 14. – P. 475-484.
- van Rensen J. J. S., Xu C., Govindjee.* Role of bicarbonate in Photosystem II // *Physiol. Plant.* – 1999. – V. 105. – P. 585-592.
- Velikova V., Tsonev T., Barta C., Centritto M., Koleva D., Stefanova M., Busheva M., Loreto F.* BVOC emissions, photosynthetic characteristics and changes in chloroplast ultrastructure of *Platanus orientalis* L. exposed to elevated CO₂ and high temperature // *Environ. Pollut.* – 2009. – V. 157. – P. 2629-2637.
- Woodward F.I., Thompson G.B., McKee I.F.* The effects of elevated concentrations of carbon dioxide on individual plants, populations, communities and ecosystems // *Ann. Bot.* – 1991. – V. 67. – P. 23-38.
- Xu C.-Y., Salih A., Ghannoum O., Tissue D. T.* Leaf structural characteristics are less important than leaf chemical properties in determining the response of leaf mass per area and photosynthesis of *Eucalyptus saligna* to industrial-age changes in [CO₂] and temperature // *J. Exp. Bot.* – 2012. – V. 63. – P. 5829-5841.
- Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoun, M., Komayama, K.* Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses // *Photosynth. Res.* – 2008. – V. 98. – P. 589-608.
- Yelle S., Beeson R.C., Trudel M.J., Gosselin A.* Acclimation of two tomato species to high atmospheric CO₂ I. Sugar and starch concentrations // *Plant Physiol.* – 1989. – V. 90. – P. 1465-1472.
- Yoshioka-Nishimura M., Nanba D., Takaki T., Ohba C., Tsumura N., Morita N., Sakamoto H., Murata K., Yamamoto Y.* Quality control of photosystem II: direct imaging of the changes in the thylakoid structure and distribution of FtsH proteases in spinach chloroplasts under light stress // *Plant Cell Physiol.* – 2014. – V. 55. – P. 1255-1265.

EFFECT OF CO₂ ON STRUCTURE OF SPINACH ISOLATED CHLOROPLASTS

M. V. Vodka, A. V. Polishchuk, N. A. Belyavskaya, E. K. Zolotareva

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: nabel2@yandex.ua*

Ultrastructural changes in spinach isolated chloroplasts following by 15-min treatments with various [CO₂] or N₂ were recorded by transmission electron microscopy. At these experimental conditions, changes were observed in the structure of the granae, the heterogeneity of thylakoid package in grana, which was manifested in an increase in thylakoid lumens and thickness of the granal thylakoids compared to the control. The most significant effects were caused by elevated [CO₂] (950 ppm). It is suggested the possible inactivation of thylakoid carbonic anhydrase under the influence of elevated [CO₂] and its involvement in the inhibition of photochemical activity of chloroplasts. The findings suggest that elevated [CO₂] negatively affect the photosynthetic apparatus, breaking the membrane system of chloroplasts, and can point to a structural role of carbonic anhydrase-dependent equilibrium CO₂/HCO₃⁻ in dynamic changes occurred in the chloroplast membrane system.

Key words: *Spinacia oleracea, grana, isolated chloroplast, carbonic anhydrase, lumen, elevated [CO₂], thylakoid*

ВЛИЯНИЕ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА НА СТРУКТУРУ ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА

М. В. Водка, А. В. Полищук, Н. А. Белявская, Е. К. Золотарёва

*Институт ботаники имени Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
E-mail: nabel2@yandex.ua*

Методом трансмиссионной электронной микроскопии изучали влияние 15-мин инкубации в атмосфере различных концентраций CO₂ или N₂ на ультраструктуру изолированных хлоропластов шпината. При этом наблюдались изменения в строении гран, неоднородность упаковки тилакоидов в гранах, что проявлялось в увеличении люминальных промежутков и толщины гранальных тилакоидов по сравнению с контролем. Наибольшие изменения ультраструктурного строения были зарегистрированы при продувке суспензии изолированных хлоропластов воздухом с повышенным содержанием CO₂ (950 ppm). Данные свидетельствуют о том, что повышенные концентрации CO₂ негативно влияют на фотосинтетический аппарат, нарушая мембранную систему хлоропластов, и могут указывать на структурную роль карбоангидразозависимого равновесия CO₂/HCO₃⁻ в динамических изменениях мембранной системы хлоропласта.

Ключевые слова: *Spinacia oleracea, grana, изолированный хлоропласт, карбоангидраза, люмин, повышенная концентрация CO₂, тилакоид*