

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

РАЗНАЯ РЕАКЦИЯ НА ЗАСОЛЕНИЕ НА УРОВНЕ
УЛЬТРА- И МЕЗОСТРУКТУРЫ У ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ
ПРОМЕЖУТОЧНОГО C_3 – C_4 ВИДА *Sedobassia sedoides*

© 2020 г. З. Ф. Рахманкулова^{а, *}, Е. В. Шуйская^{а, **}, Л. А. Халилова^а, О. Л. Бурундукова^б,
Т. А. Веливецкая^с, А. В. Игнатьев^с, Ю. В. Орлова^а

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

^бФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

^сФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Дальневосточный геологический институт
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

*e-mail: zulfirar@mail.ru;

**e-mail: evshuya@gmail.com

Поступила в редакцию 03.07.2019 г.

После доработки 17.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Исследовали растения из двух популяций (П1 и П2) ксерогалофита *Sedobassia sedoides* (Chenopodiaceae) с промежуточным C_3 – C_4 типом фотосинтеза. Определяли морфо-физиологические параметры: сухую массу надземной части, максимальный квантовый выход фотосистемы (ФС) II, ультра- и мезоструктуру листа, изотопную дискриминацию углерода ($\delta^{13}C$) у растений, выращенных в контрольных условиях и при умеренном засолении (0 и 200 мМ NaCl). По значениям $\delta^{13}C$ и эффективности ФС II достоверных различий между популяциями не выявлено. В контрольных условиях в кранц-подобных клетках обкладки проводящего пучка обеих популяций хлоропласты и митохондрии располагались на стороне, прилегающей к сосудистому пучку, что характерно для C_2 типа фотосинтеза (с фотодыхательным CO_2 концентрирующим механизмом). Растения популяции П2 отличались большим объемом кранц-подобных клеток обкладки и большим количеством в них более крупных хлоропластов и митохондрий по сравнению с П1. По структурным параметрам листа растения П1 можно отнести к прото-Кранц типу фотосинтеза (переходный от C_3 - к C_2 -фотосинтезу), а растения П2 к C_2 -фотосинтезу. При засолении накопление сухой биомассы было снижено в обеих популяциях, но более значительно в П1. Исследование ультраструктуры органелл у растений обеих популяций, выявило различия в реакции на засоление, особенно выраженное в кранц-подобных клетках обкладки. У растений П1 наблюдалось увеличение площади хлоропластов и митохондрий, тогда как у растений П2 площадь и количество хлоропластов в условиях стресса не изменялись, а площадь и количество митохондрий снижались. В клетках растений обеих популяций имели место деградиационные процессы, более выраженные у растений П1, которые проявлялись в скручивании хлоропластов и нарушении их гранальности. У растений П2 в кранц-подобных клетках обкладки органеллы сохранялись лучше, но встречались полностью деградированные клетки по вакуолярному типу. Таким образом, выявлены внутривидовые ультра- и мезоструктурные различия у растений двух популяций C_3 – C_4 вида *S. sedoides*, которые отражают разные этапы формирования фотодыхательного CO_2 -концентрирующего механизма. В условиях засоления растения из двух разных популяций проявили различные стратегии адаптации на уровне ультра- и мезоструктуры листа.

Ключевые слова: *Sedobassia sedoides*, C_2 -фотосинтез, ультраструктура, хлоропласты, митохондрии, засоление

DOI: 10.31857/S0015330320040132

ВВЕДЕНИЕ

Необходимым условием и важным этапом C_4 эволюции является создание фотодыхательного углеродного насоса, так называемого C_2 -фотосинтеза, который использует фотодыхательный

глициновый челнок для концентрирования CO_2 в клетках обкладки и рассматривается как “эволюционный мост” между C_3 - и C_4 -типами фотосинтеза [1, 2, 3]. Обычно C_2 -фотосинтез встречается в C_3 – C_4 промежуточных видах [1] и поэтому дан-

ные виды представляют большой интерес для изучения эволюции C_4 -фотосинтеза [4].

C_3 – C_4 виды выявлены в 14 семействах, в том числе в *Chenopodiaceae* [4]. К представителям данного семейства относится вид *Sedobassia sedoides* (подсемейство *Camphorosmoideae*), который на основе анатомических особенностей, а также анализа газообмена и иммунолокализации глициндекарбоксилазы [4] был отнесен к промежуточным C_3 – C_4 видам с C_2 -фотосинтезом [1, 5]. Разные виды с C_2 -фотосинтезом могут соответствовать разным этапам C_4 эволюции. В ходе изучения нескольких видов *Flaveria* и *Heliotropus* с разным фотосинтезом были выделены следующие этапы C_4 эволюции: C_3 – прото-Кранц – C_2 – C_4 [1]. Термин “прото-Кранц” был введен для описания начальной фазы C_4 эволюции. Кранц-анатомия рассматривается как структура, необходимая для захвата и утилизации фотодыхательного CO_2 [6]. К настоящему времени выделены основные черты развития и оптимизации C_4 цикла и параметры, подчеркивающие потенциальные изменения устойчивых характеристик в ходе данных этапов. При этом этап C_2 был разделен на два типа, различающихся по активности ФЕП-карбоксилазы, и введен этап C_4 -подобного фотосинтеза, отличающийся от C_4 -фотосинтеза только активностью Рубиско в клетках мезофилла [5]. Было показано, что C_2 -кранц – это упрощенная версия C_4 -кранц анатомии, а прото-Кранц – начальная стадия формирования C_2 -кранц, сопровождающаяся сдвигом митохондрий к внутреннему краю стенки клеток обкладки, примыкающей к проводящему пучку. Таким образом, эволюционный прогресс от C_3 - к C_4 -фотосинтезу содержит три отдельные фазы: прото-Кранц – C_2 (I и II типа) – C_4 -подобный фотосинтез [5].

Определение наличия и активности C_4 цикла у C_3 – C_4 промежуточных видов оказалось очень сложным, особенно у видов, находящихся на начальных фазах эволюционного C_3 – C_4 перехода из-за низкой активности C_4 цикла. Положительный результат дает использование комбинации из нескольких методов, например, сочетание измерения CO_2 -газообмена, лазерной спектроскопии (TDLAS) и оценки величины дискриминации изотопа углерода при низком парциальном давлении O_2 [7]. В тоже время есть данные, свидетельствующие о том, что C_2 - и C_3 -растения могут иметь схожие значения изотопной дискриминации [1].

Исследования гранальности в хлоропластах клеток обкладки у промежуточных C_3 – C_4 и C_4 видов *Flaveria* показали, что фотосинтетический перенос электронов у них отличается. Было установлено, что растения с C_4 метаболизмом имеют

более низкую активность ФС II и более активный циклический транспорт электронов. Предполагается, что эти изменения имели важное значение для формирования C_4 фотосинтеза из промежуточного C_3 – C_4 фотосинтеза у *Flaveria* [8].

Одним из подходов для изучения C_2 фотосинтеза и этапов C_4 эволюции является анализ анатомического строения листа на уровне мезо- и ультраструктуры [4, 9]. Понятие “мезоструктура” было введено академиком А.Т. Мокроносовым и отражает клеточный и тканевой уровень организации структуры листа. Данный термин охватывает систему морфофизиологических характеристик листа, клеток мезофилла, обкладки проводящего пучка, а также хлоропластов. Показатели мезоструктуры листа могут значительно варьировать в зависимости от внешних факторов среды, от физиологического состояния растений, а также от типа фотосинтеза [1, 10]. Изучение ультраструктуры клеток мезофилла и клеток обкладки C_3 – C_4 вида, оценка расположения органелл (митохондрий и хлоропластов), их площади позволяет дифференцировать отдельные этапы C_2 фотосинтеза [1].

Известно, что особенно трудно выявить внутривидовые различия, отражающие этапы C_4 эволюции [11]. Ранее нами были показаны подобные различия между двумя популяциями промежуточного C_3 – C_4 вида *S. sedoides*. Наличие разных популяций одного вида было подтверждено с помощью популяционно-генетического анализа [12]. Проведенные морфо-физиологические и биохимические исследования показали, что растения из разных популяций различаются по продуктивности (по приросту биомассы) и устойчивости (по интенсивности дыхания, соотношению Na^+/K^+ и содержанию пролина в побегах растений) в условиях засоления [3, 12, 13]. Разные популяции *S. sedoides* отличались также по интенсивности фотодыхания и активности циклического транспорта электронов ФС I. Было высказано предположение о разной степени проявления у них C_4 синдрома и принадлежности разных популяций *S. sedoides* к разным этапам C_2 фотосинтеза [3].

Засоление является одним из основных абиотических стрессов, ограничивающих рост и продуктивность растений. Адаптация растений или устойчивость к засолению включает в себя сложные биохимические, физиологические и молекулярные механизмы [14]. Механизм адаптации на ранних этапах реализуется путем модификации внутриклеточных физиологических процессов, сопровождающихся ультраструктурными изменениями. Согласно ультраструктурному анализу наиболее вариabельными и высоко динамичными клеточными органеллами в стрессовых условиях являются хлоропласты [15] и митохондрии [16]. На C_4 галофитах показано, что хлоропласты

клеток обкладки более устойчивы к засолению, за счет увеличения в них гранальности [17], а на C_4 гликофитах установлено, что хлоропласты клеток мезофилла более чувствительные, у них наблюдается формирование шаровидной [18] или волнистой (ажурной) структуры [19]. В клетках обкладки C_4 и у промежуточных C_3 – C_4 видов при засолении формируется уникальная структура “хлоропластные карманы”, т.е. инвагинации хлоропластов в которые включаются митохондрии и пероксисомы [20]. Информация об ультраструктурных изменениях у C_3 – C_4 видов при засолении крайне фрагментарна и нуждается в дальнейших исследованиях.

Целью данной работы явилось изучение морфо-физиологических и структурных характеристик двух разных популяций промежуточного C_3 – C_4 ксерогалофита *S. sedoides*, предположительно с разными этапами C_2 фотосинтеза, в условиях умеренного засоления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В естественных условиях Южного Урала были выбраны две популяции ксерогалофита *Sedobaschia sedoides* (Pall.) Freitag & G. Kadereit (Chenopodiaceae), которые различались по продуктивности почти в 10 раз (сухая масса надземной части составила 0.41 ± 0.1 и 3.12 ± 0.5 г). Для подтверждения генетических различий между данными популяциями был проведен популяционно-генетический анализ. Для этого были собраны семена с 10–20 отдельных растений *S. sedoides* в каждой популяции. Экстракцию и разделение белков семян (глутамат-оксалоацетат-трансаминаза (Е.С. 2.6.1.1), диафороза (Е.С. 1.6.99), глутаматдегидрогеназа (Е.С. 1.4.1.2), супероксиддисмутаза (Е.С. 1.15.1.1), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.44), малатдегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.37), малик энзим (Е.С. 1.1.1.40)) проводили по методике Гончаренко и др. [21] с модификациями. Оценку генетической дистанции между популяциями проводили в программе PopGen 1.32 [22].

Для проведения лабораторных экспериментов семена *S. sedoides* из двух популяций проращивали в дистиллированной воде. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на перлит, пропитанный 50% питательным раствором Хогланда. Растения выращивали под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/(м² с), 16-часовом фотопериоде и температуре 25°C. Растения выращивали в кюветах на агроперлите. Для создания умеренного для ксерогалофита *S. sedoides* засоления в экспериментах использовали раствор 200 мМ NaCl, который заливали в поддоны, на которые переносили кюветы с растениями в возрасте 30 дней. Опыт

длился 14 дней, в ходе которого NaCl вносили в поддоны дважды. В качестве контроля использовали 50% раствор Хогланда. Для определения сухой биомассы (надземная часть растений) растительные пробы (не менее 5 растений для каждого варианта) высушивали двое суток при 80°C.

Определение квантового выхода флуоресценции ФС II адаптированного к темноте (20 мин) фрагмента листа осуществляли с помощью PAM флуориметра (PAM 101, “Walz”, Германия). Измеряли максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II (F_v/F_m). Измерение проводили с досветкой образца слабым модулированным потоком красного света по ходу измерений, которая осуществлялась с помощью PDA-100 (“Walz”), преобразующим первичный сигнал от PAM-101 на компьютер со специализированным программным интерфейсом. Расчет показателей проводили на основании текущего значения минимальной (F_0) и максимальной (F_m) флуоресценции адаптированного к темноте листа по формуле $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. F_0 измеряли при освещении 0.1 мкмоль фотонов/(м² с), F_m при действии насыщающего импульсного света (SP, 5000 мкмоль фотонов/(м² с) в течение 0.8 с). Измерения проводились на 3–5 растениях для каждого варианта опыта.

Изотопный анализ листьев 3–5 растений каждого варианта выполнен в лаборатории стабильных изотопов Дальневосточного геологического института ДВО РАН с использованием элементного анализатора Flash EA 1112 (“ThermoFinnigan”, Германия), соединенного с изотопным масс-спектрометром MAT 253 (“ThermoFinnigan”). Результаты анализов представлены в общепринятой форме:

$$\delta = (R_{\text{образца}} - R_{\text{стандарта}}) \times 1000 / R_{\text{стандарта}},$$

где R – отношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и выражены в промиллях (‰) относительно международных эталонов для углерода – карбонат VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite, $\delta^{13}\text{C} = 0$). Воспроизводимость результатов ± 0.1 ‰.

Ультраструктуру клеток изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой, как описано ранее [23]. Срезы на сеточках контрастировали спиртовым раствором уранилацетата. Контрастированные срезы просматривали в электронном микроскопе LIBRA 120 (Германия). Площади органелл на срезах измеряли с помощью программы ZEN-2012 Microsoft, используя инструмент “контур”. При изучении ультраструктуры клеток мезофилла и обкладки листа, были использованы 90–100 срезов (10 листьев с 3–5 растений на каждый вариант).

Определение параметров мезоструктуры листа проводили по методике А.Т. Мокроносова [24]. Количество хлоропластов в кранц-подобных

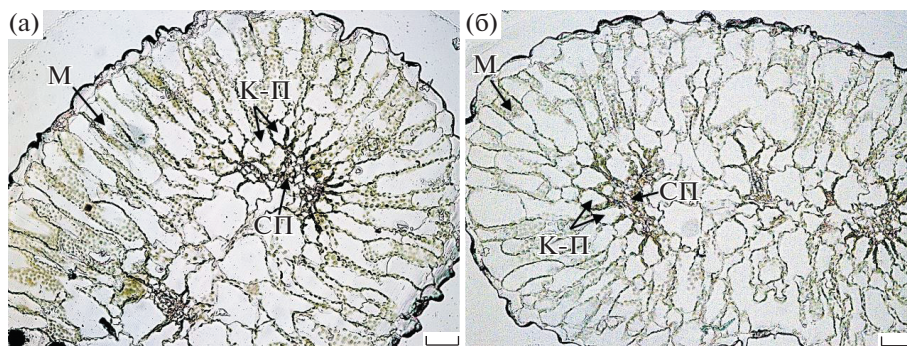


Рис. 1. Поперечный срез листа *Sedobassia sedoides* из двух популяций П1 (а) и П2 (б). Масштабная линейка — 50 мкм. М — клетки мезофилла, К-П — Kranz-подобные клетки обкладки, СП — сосудистый пучок.

клетках обкладки проводящего пучка (термин Kranz-подобные клетки взят по Freitag [9]) подсчитывали в 30 клетках мацерата, приготовленного из фиксированных в 3.5% растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (pH = 7) 5–10 листьев. Растительный материал мацерировали в 5% растворе CrO_3 в 1 N HCl. Оси клеток измеряли на поперечных срезах листьев 5 растений (по 7 измерений на каждом срезе) для каждого варианта, объем Kranz-подобных клеток рассчитывали по формуле эллипсоида. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Микротехническая лаборатория Ботанического сада-института ДВО РАН”.

Во всех экспериментах было не менее трех биологических повторностей. Для факторного (ANOVA) анализа использовали программу SigmaPlot 12.0. На графиках приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Различия считались достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Популяционно-генетический анализ на основе 8 ферментных систем показал, что популяции П1 и П2 *S. sedoides* значительно различаются (генетические расстояния (D) = 0.0805). Между популяциями П1 и П2 *S. sedoides* в контрольных условиях достоверных различий по ростовым параметрам не выявлено (табл. 1). При засолении накопление сухой биомассы было снижено в обеих популяциях. Более значительно в П1 — на 27%. По значениям $\delta^{13}\text{C}$ и максимального квантового выхода ФС II в контрольных условиях и при засолении достоверных различий между популяциями не установлено (табл. 1).

Исследование ультраструктуры поперечных срезов листьев растений из двух популяций *S. sedoides* показал, что анатомический тип представляет собой вариант промежуточного C_3 – C_4 фотосинтеза, для которого характерно 2–3 слоя клеток

мезофилла и внутренний слой Kranz-подобных клеток обкладки в контакте с проводящим пучком. Kranz-подобные клетки образуют ровный ряд и более четко выражены у представителей П2 и в меньшей степени у П1 (рис. 1).

Исследование мезоструктуры листьев растений из двух популяций *S. sedoides* не выявило различий между П1 и П2 по объему клеток мезофилла в контрольных условиях, но при этом, в обеих популяциях наблюдалось увеличение объема клеток при засолении (табл. 1). В тоже время в контрольных условиях растения П2 отличались от растений П1 достоверно большим объемом Kranz-подобных клеток обкладки проводящего пучка (в 1.5–1.8 раз). Также, наблюдались различия по соотношению объемов клеток мезофилла и Kranz-подобных клеток. У П2 в контроле и при засолении данное соотношение было достоверно меньше и составляло 1.6–1.8, тогда как у П1 — 2.9–3.2. Аналогичная картина наблюдалась и по соотношению числа хлоропластов в клетках мезофилла и в Kranz-подобных клетках: у П1 оно составило 2.8–3.1, а у П2 — 1.5–1.7 (табл. 1).

Изучение ультраструктуры показало, что в контрольных условиях популяции отличались по размеру и количеству хлоропластов и митохондрий. Так, площадь одного и общая площадь всех хлоропластов видимых на срезе в клетках мезофилла и в Kranz-подобных клетках была значительно больше в П2 (рис. 2а–г). При этом количество хлоропластов в расчете на клетку мезофилла у растений П1 и П2 не различалось, а в Kranz-подобных клетках обкладки у П2 было больше на 30% (рис. 2д, е). Также у растений из П2 была больше площадь одной и общая площадь всех митохондрий видимых на срезе в клетках мезофилла и в Kranz-подобных клетках обкладки (рис. 3а–г). При этом количество митохондрий в клетках мезофилла и Kranz-подобных клеток обкладки было также больше на 50 и 57% в П2 (рис. 3д, е). У растений обеих популяций количество митохондрий было значительно больше в Kranz-подоб-

Таблица 1. Морфо-физиологические и структурные характеристики двух популяций (П1 и П2) промежуточного C₃–C₄ вида *Sedobassia sedoides* в контроле и в условиях умеренного засоления

Параметры	П1		П2	
	контроль	NaCl	контроль	NaCl
Сухая биомасса, г	0.111 ± 0.007 ^a	0.081 ± 0.013 ^{bc}	0.092 ± 0.015 ^{ab}	0.070 ± 0.005 ^c
Изотопная дискриминация, δ ¹³ C, ‰	–34.85 ± 0.08 ^a	–34.5 ± 0.04 ^a	–35.0 ± 0.02 ^a	–34.8 ± 0.03 ^a
Максимальный квантовый выход ФС II (F _v /F _m)	0.83 ± 0.008 ^a	0.81 ± 0.009 ^a	0.80 ± 0.003 ^a	0.81 ± 0.008 ^a
Показатели мезоструктуры:				
Объем 1 клетки мезофилла, тыс. мкм ³	37 ± 1.8 ^a	42 ± 2.1 ^b	34 ± 1.5 ^a	38 ± 2.0 ^b
Объем 1 Kranz-подобной клетки обкладки проводящего пучка, тыс. мкм ³	12.7 ± 1.6 ^a	13.0 ± 1.0 ^a	19.0 ± 2.0 ^b	23.0 ± 2.0 ^b
Соотношение объема клеток мезофилла и Kranz-подобных клеток обкладки	2.9	3.2	1.8	1.6
Соотношение числа хлоропластов в клетках мезофилла и Kranz-подобных клетках обкладки	3.1	2.8	1.7	1.5
Сравнительная характеристика ультраструктуры Kranz-подобных клеток обкладки, %				
Площадь 1 хлоропласта	100	167*	155*	Не меняется**
Общая площадь хлоропластов	100	304	490	Не меняется
Расположение митохондрий	более выраженное подковообразное скопление вдоль внутренних периклиальных стенок		вдоль антиклинальных и внутренних периклиальных стенок	
Количество митохондрий	100	Не меняется	157	69
Площадь 1 митохондрии	100	126	140	68
Общая площадь митохондрий	100	159	258	45
Признаки деградации при засолении		Разбухание и скручивание хлоропластов, появление “ажурной” структуры гран		Органеллы сохранялись лучше, но наблюдался лизис отдельных клеток обкладки
Этапы эволюции C ₄ фотосинтеза	прото-Кранц		C ₂ фотосинтез	

* В данном столбце % относительно контроля П1, ** в данном столбце % относительно контроля П2

ных клетках обкладки, по сравнению с клетками мезофилла, у П1 в 10 раз, у П2 в 6 раз (рис. 3д, е). Большой объем Kranz-подобных клеток обкладки и большее в них количество, более крупных по площади хлоропластов и митохондрий, свидетельствуют о том, что Кранц синдром у растений П2 выражен в большей степени, чем у П1.

Исследование ультраструктуры органелл клеток мезофилла и Kranz-подобных клеток обкладки

у представителей обеих популяций выявило внутривидовые различия в реакции растений на засоление. Внесение NaCl в питательный раствор привело к увеличению площади одного хлоропласта у растений П1 в клетках мезофилла (в 1.5 раза) и в Kranz-подобных клетках обкладки (в 1.7 раза), и общей площади хлоропластов в Kranz-подобных клетках (в 3 раза), тогда как у растений П2 площадь хлоропластов в условиях стресса не изменялась (рис. 2а, б, г). Исследование митохондрий у рас-

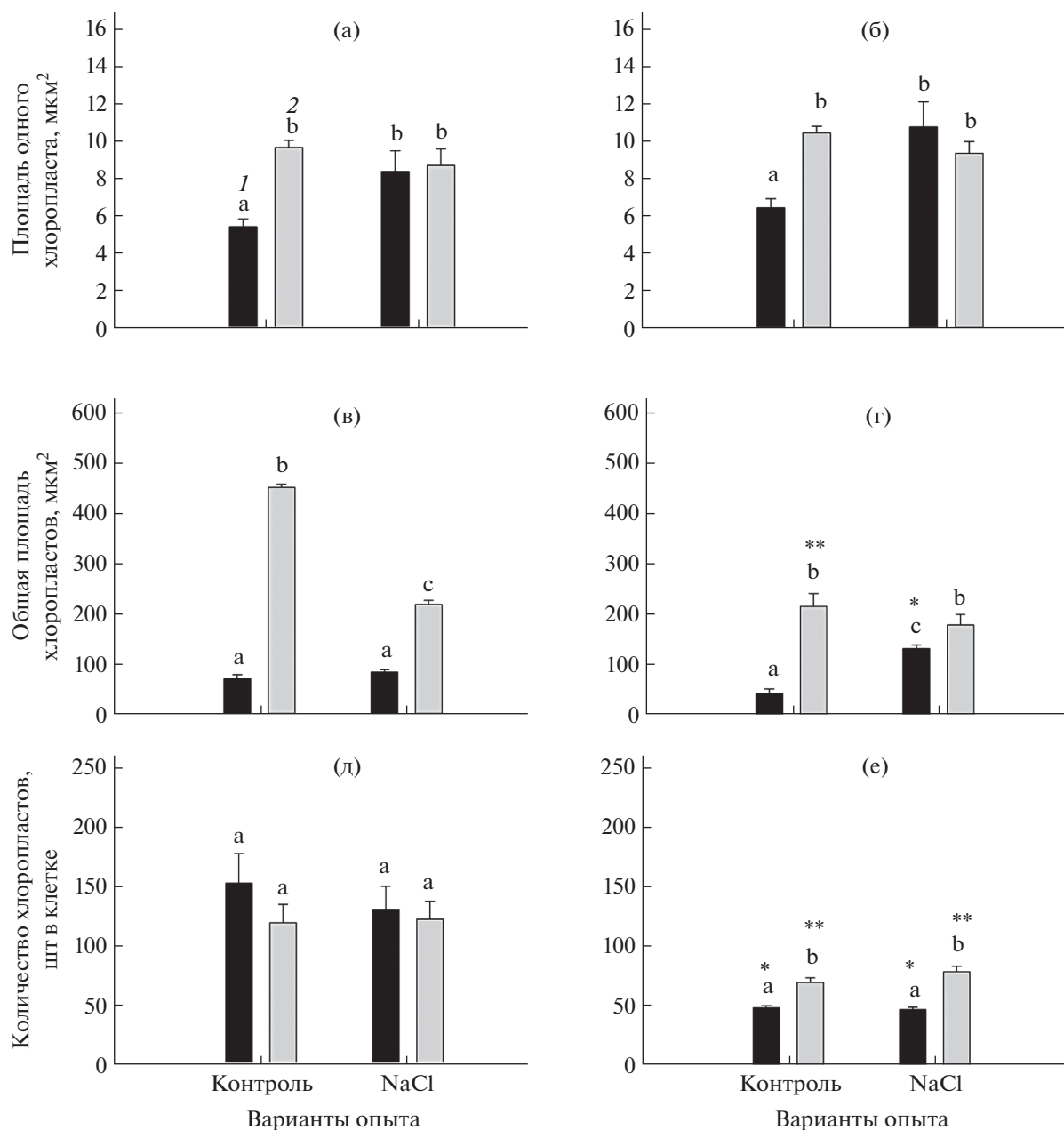


Рис. 2. Площадь одного хлоропласта (а, б), общая площадь хлоропластов (в, г) и количество хлоропластов (д, е) в клетках мезофилла (а, в, д) и в кранц-подобных клетках обкладки проводящего пучка (б, г, е) у *Sedobassia sedoides* из двух популяций (П1 и П2) в контроле и в условиях умеренного засоления. 1 – П1, 2 – П2. Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия внутри клеток мезофилла или кранц-подобных, * – между клетками мезофилла и кранц-подобными клетками в П1, ** – между клетками мезофилла или кранц-подобными клетками в П2 на уровне $P < 0.05$.

тений обеих популяций, показало, что при засолении у П1 площадь одной и общая площадь всех митохондрий видимых на срезе в клетках мезофилла и в кранц-подобных клетках обкладки возрастала, а у П2 наблюдалось снижение всех этих параметров, а также количества митохондрий в кранц-подобных клетках обкладки (рис. 3а–г, е).

В обеих популяциях в кранц-подобных клетках обкладки наблюдалось скопление митохондрий преимущественно около сосудистого пучка (СП) и у радиальных граней (рис. 4а, б). При этом растения П2 отличались большим количеством митохондрий (рис. 3е) и хлоропластов (рис. 2е), расположенных вдоль стенок кранц-подобных клеток,

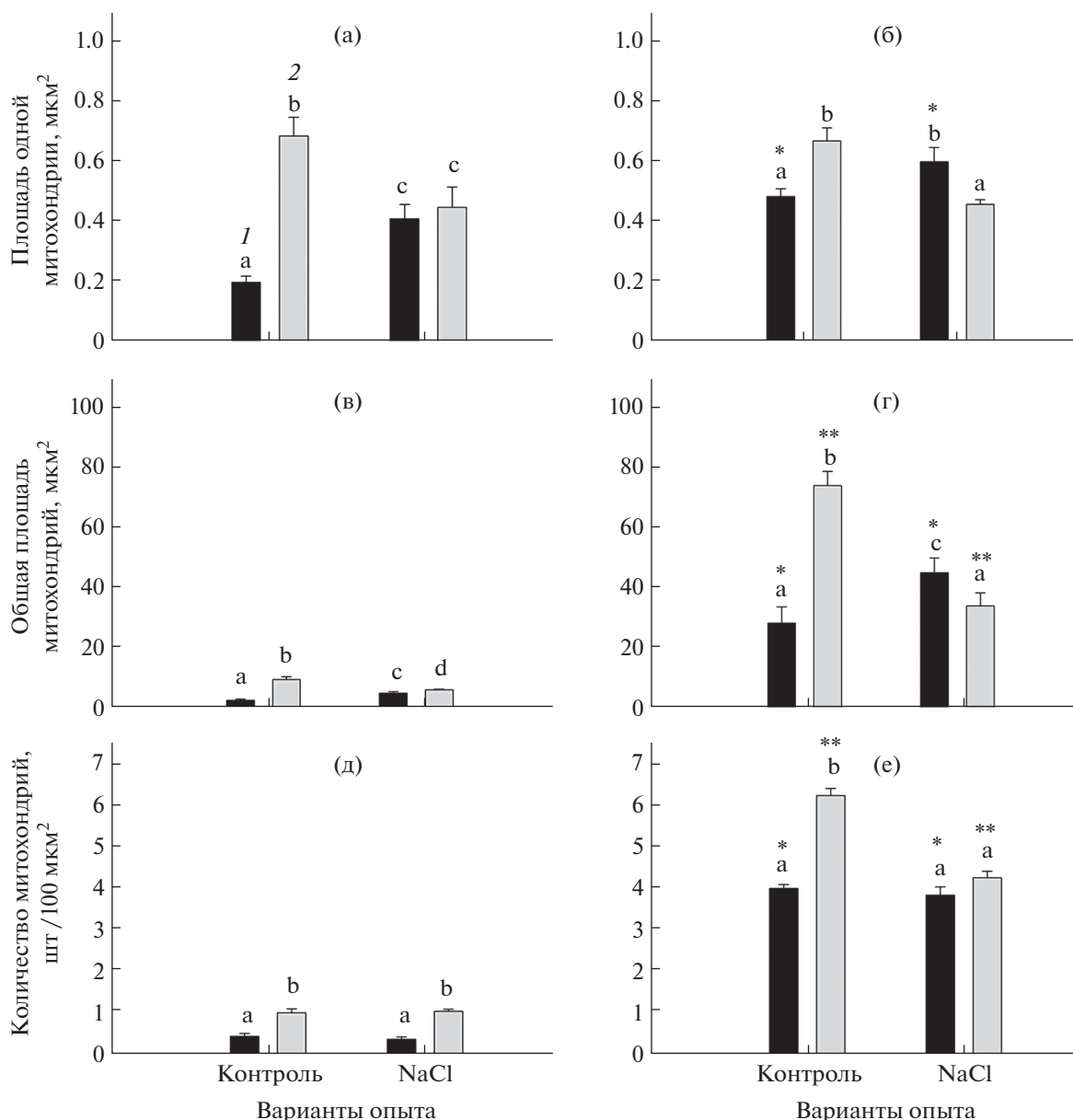


Рис. 3. Площадь одной митохондрии (а, б), общая площадь митохондрий (в, г) и количество митохондрий (д, е) в клетках мезофилла (а, в, д) и в Kranz-подобных клетках обкладки проводящего пучка (б, г, е) у *Sedobassia sedoides* из двух популяций (П1 и П2) в контроле и в условиях умеренного засоления. 1 – П1, 2 – П2. Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия внутри клеток мезофилла или Kranz-подобных, * – между клетками мезофилла и Kranz-подобными клетками в П1, ** – между клетками мезофилла или Kranz-подобными клетками в П2 на уровне $P < 0.05$.

прилегающих к сосудистому пучку (рис. 4б). Выращивание растений обеих популяций в условиях умеренного засоления, привело к ряду изменений в ультраструктуре клеток листа. В Kranz-подобных клетках обкладки листа растений популяции П1 хлоропласты приобретали шарообразную форму и располагались вдоль клеточных стенок (рис. 4в), мембранная система тилакоидов увеличивалась в объеме, в результате чего формирова-

лась “ажурная” структура ламелл, что свидетельствовало о нарушении их гранальности и о начале деградиционных процессов в клетках (рис. 4в, вставка). У растений П2 в Kranz-подобных клетках обкладки хлоропласты почти полностью были заполнены мембранными компонентами с очень плотной упаковкой. Основную часть объема хлоропластов занимала ламеллярная система со стопками отчетливо выраженных гран. Про-

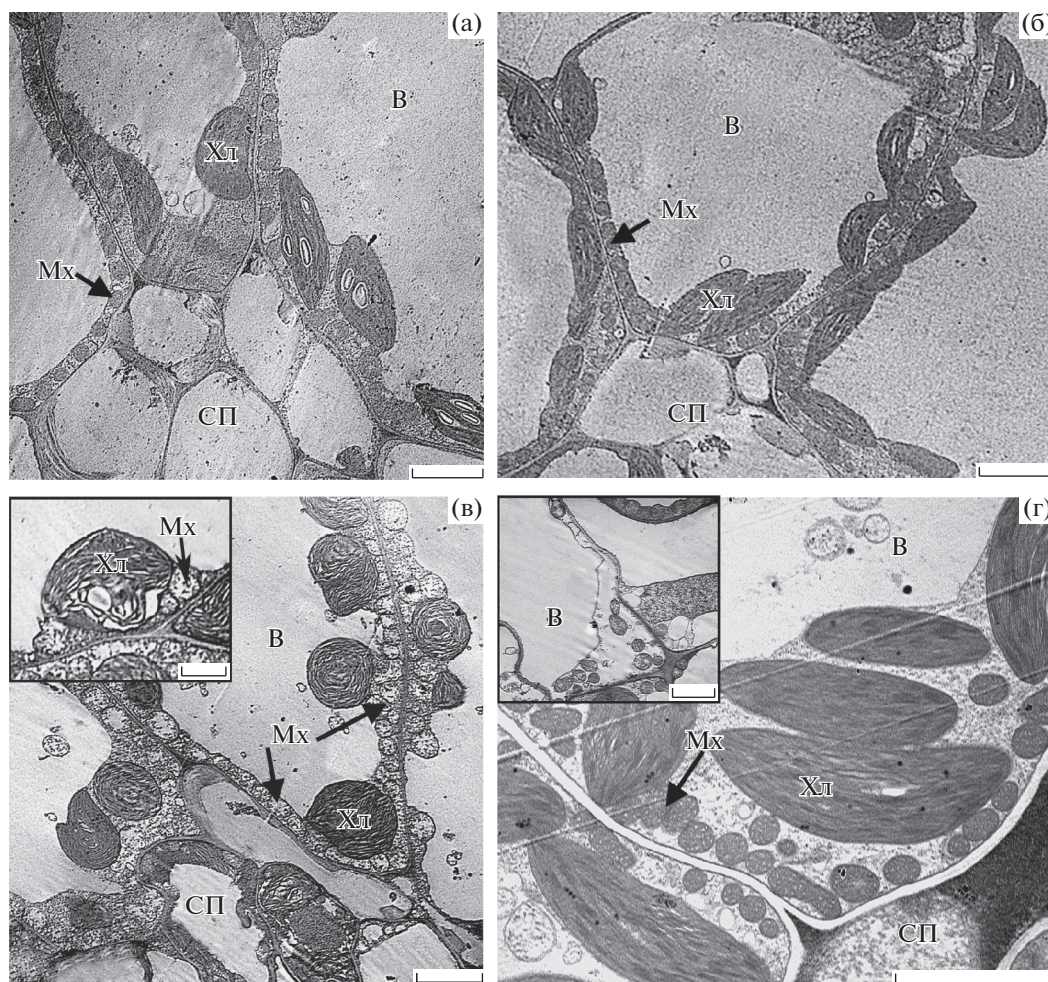


Рис. 4. Ультраструктура клеток *Sedobassia sedoides* из популяций П1 (а, в) и П2 (б, г) в контроле (а, б) и в условиях умеренного засоления (в, г). Хл — хлоропласты, Мх — митохондрии, СП — сосудистый пучок, В — вакуоль. Масштабная линейка — 0,5 мкм. “Ажурная” структура хлоропластов и разбухшие митохондрии клеток мезофилла популяции П1 в условиях умеренного засоления (вставка (4в)). Процессы лизиса органелл в некоторых клетках обкладки листа популяции П2 при засолении (вставка (4г)).

цессы внутриклеточного разрушения в кранц-подобных клетках обкладки у растений П2 наблюдались только в отдельных клетках и протекали преимущественно по вакуолярному типу (рис. 4 г, вставка).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный популяционно-генетический анализ показал, что растения промежуточного C_3 – C_4 вида *S. sedoides* значительно отличающиеся по продуктивности в естественных условиях, характеризуются генетическими отличиями и принадлежат к разным популяциям (П1 и П2). Однако достоверных различий между популяциями по значениям $\delta^{13}C$, сухой массы надземной части растений и функционированию фотосистемы II не установлено. Отсутствие различий по значениям $\delta^{13}C$ совпадает с данными других авторов [1] и еще

раз подтверждает сложность выявления внутривидовых отличительных особенностей [11]. Проведенные нами ранее морфо-физиологические и биохимические исследования растений из разных популяций *S. sedoides*, позволили предположить, что исследуемые популяции соответствуют разным этапам C_4 эволюции [3, 12, 13]. Анализ ультра- и мезоструктуры растений из двух популяций (П1 и П2) *S. sedoides* в норме и особенно в условиях умеренного засоления также выявил различия между популяциями внутри одного вида.

Известно, что *S. sedoides* имеет специфическое анатомическое строение, которое выделено в отдельный тип — *Sedobassia* тип. Данный анатомический тип представляет собой вариант промежуточного C_3 – C_4 фотосинтеза. Кранц-подобные клетки обкладки отличаются от обычных клеток палисадного мезофилла более компактной округ-

лой формой, утолщенными стенками, и специфическим расположением хлоропластов и митохондрий вдоль внутренней периклинальной и антиклинальной стенок, что характерно для C_2 типа фотосинтеза [9]. На других C_2 видах (*Homolepis aturensis* и *Steinchisma hians*) также было показано, что в клетках обкладки все митохондрии, пероксисомы и большинство хлоропластов расположены центростремительно [5]. В наших экспериментах у *S. sedoides* крапц-подобные клетки обкладки образовывали неполное кольцо вокруг групп пучков на краю листа, при этом, у растений П2 крапц-подобные клетки имели более ровный и четкий ряд, по сравнению с растениями П1 (рис. 1а, б). Подобная структура поперечного среза листа *S. sedoides* показана и другими авторами [9].

Известно, что эволюционный переход от C_3 к C_4 сопровождался увеличением объема клеток обкладки [25] и возрастанием в них объема и количества органелл, в частности числа хлоропластов [26]. А метаболизм фотодыхательного глицина в клетках обкладки, способствовал увеличению в них числа митохондрий и пероксисом [27–29]. Исследования расположения, количества и площади органелл (хлоропластов и митохондрий) в крапц-подобных клетках обкладки и клетках мезофилла растений позволили выявить внутривидовые различия между популяциями П1 и П2 и предположить, что данные популяции отличаются по стадии формирования фотодыхательного CO_2 -концентрирующего механизма. Так, растения П2 характеризуются большим объемом крапц-подобных клеток обкладки, большим содержанием в них хлоропластов и митохондрий, меньшим соотношением объемов клеток мезофилла и крапц-подобных клеток, соотношением числа хлоропластов в них, а также значительно большей общей площадью хлоропластов и митохондрий (табл. 1, рис. 2б, г, е, 3б, г, е). Эти структурные характеристики свидетельствуют о том, что Крапц синдром у популяции П2 выражен в большей степени. Исходя из полученных данных растения популяции П1 можно отнести к прото-Крапц типу фотосинтеза (переходный от C_3 - к C_2 -фотосинтезу), а растения популяции П2 к C_2 -фотосинтезу (с вполне сформированным фотодыхательным CO_2 концентрирующим механизмом).

Известно, что клетки мезофилла по сравнению с клетками обкладки более чувствительны к засолению, это проявляется в нарушении гранальности хлоропластов и набухании тилакоидов [18, 19]. Исследование площади хлоропластов видимых на срезах клеток мезофилла в условиях засоления также выявило различия между популяциями: у П1 – площадь одного хлоропласта увеличилась, общая площадь хлоропластов не изменилась, у П2 – площадь одного хлоропласта не измени-

лась, общая площадь хлоропластов уменьшилась (рис. 2а, в). При этом у обеих популяций сохранялось одинаковое число хлоропластов в расчете на клетку (рис. 2д) и увеличивался объем клеток мезофилла (табл. 1). Увеличение объема клеток вероятно приводило к более рассеянному расположению хлоропластов в клетке, вследствие чего число хлоропластов, видимых на срезе уменьшилось и поэтому общая их площадь на срезе осталась прежней в П1 и уменьшалась у П2. В крапц-подобных клетках при засолении в П2 не изменялись параметры хлоропластов, а в П1 наблюдалось увеличение их площади (рис. 1б, г).

В условиях засоления в клетках растений обеих популяций имели место деградиационные процессы, более выраженные у растений популяции П1 (рис. 4, табл. 1). Наблюдаемое увеличение размеров хлоропластов, в результате набухания ламеллярной системы, и митохондрий в крапц-подобных клетках обкладки (рис. 2б, г, 3б, г) сопровождалось нарушением гранальности хлоропластов и приводило к образованию характерной для условий засоления “ажурной” структуры (рис. 4в, вставка), иногда хлоропласты скручивались полукругом и в последующем приобретали шарообразную форму (рис. 4в). Подобные результаты были получены на неустойчивых к засолению C_4 видах [18, 19]. Кроме того, в некоторых случаях, скручивание хлоропластов растений П1 при засолении может приводить к формированию “хлоропластных карманов”, т.е. инвагинациям хлоропластов, в которые включались митохондрии и пероксисомы (рис. 4в, вставка). Подобные структуры имели место в клетках обкладки C_4 и у промежуточных C_3 – C_4 видов при засолении, на которых было показано, что NaCl вызывает избыточное накопление АФК в хлоропластах и набухание тилакоидов. В этих условиях тесный контакт между хлоропластами, митохондриями и пероксисомами очень важен для подавления накопления избыточной энергии в хлоропластах путем поддержания фотодыхательного метаболизма [20].

У представителей обеих популяций *S. sedoides* наблюдалось перемещение поврежденных органелл в вакуоль, что также свидетельствует о проявлении деградиационных процессов в этих клетках, по морфологической картине напоминающих запрограммированную клеточную смерть вакуолярного типа. У растений П2 в клетках обкладки органеллы сохранялись лучше, хотя и были полностью деградированные по вакуолярному типу клетки (рис. 4г, вставка). В тоже время имеющиеся в условиях засоления ультраструктурные изменения и деградиационные процессы в хлоропластах П1 и П2 не приводили к значительным функциональным нарушениям – не выявлено достоверных различий в значениях максимального квантового выхода ФС II (табл. 1). Это можно объяснить

устойчивостью ксерогалофита *S. sedoides* к умеренному засолению. Подобные результаты были получены нами ранее при слабом и умеренном засолении на разных популяциях *S. sedoides* [13] и другими авторами на галофитах сем. Chenopodiaceae [30]. Кроме того показано, что небольшие концентрации ионов натрия в строме хлоропластов у галофитов играют положительную функциональную роль в активности ФС II [17].

Таким образом, выявлены внутривидовые ультра- и мезоструктурные различия у растений разных популяций промежуточного C_3 – C_4 вида *S. sedoides*, которые отражают разные этапы формирования фотодыхательного CO_2 -концентрирующего механизма в процессе эволюции C_4 фотосинтеза (П1 – прото-Кранц, П2 – C_2 фотосинтез). В условиях засоления растения из изученных популяций проявили различные стратегии адаптации на уровне ультра- и мезоструктуры клеток мезофилла и, особенно, кранц-подобных клеток обкладки, которые выражались в увеличении площади единичных органелл и общей площади хлоропластов и митохондрий у растений П1, и уменьшении площади единичных и общей площади митохондрий и их количества в П2.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sage R.F., Sage T.L., Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C_4 photosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2012. V. 63. P. 19. doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105511
2. Рахманкулова З.Ф. Фотодыхание: роль в продукционном процессе и в эволюции C_4 растений // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 163.
3. Рахманкулова З.Ф., Шуйская Е.В., Воронин П.Ю., Веливецкая Т.А., Игнатъев А.В., Усманов И.Ю. Роль фотодыхания и циклического транспорта электронов в эволюции C_4 фотосинтеза на примере промежуточного C_3 – C_4 вида *Sedobassia sedoides* // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 232.
4. Voznesenskaya E.V., Koteyeva N.K., Akhiani H., Roalson E.H., Edwards G.E. Structural and physiological analyses in Salsola (Chenopodiaceae) indicate multiple transitions among C_3 , intermediate, and C_4 photosynthesis // Journal of Experimental Botany. 2013. V. 64. P. 3583. doi.org/https://doi.org/10.1093/jxb/ert191
5. Sage R.F., Khoshnavesh R., Sage T.L. From proto-Kranz to C_4 Kranz: building the bridge to C_4 Photosynthesis // Journal of Experimental Botany. 2014. V. 65. P. 3341. https://doi.org/10.1093/jxb/eru180
6. Bauwe H. Photorespiration: the bridge to C_4 photosynthesis // C_4 photosynthesis and related CO_2 concentrating mechanisms, Advances in Photosynthesis / Eds. Raghavendra A.S., Sage R.F. Heidelberg-Berlin: Springer Verlag, 2011. V. 32. P. 81.
7. Alonso-Cantabrana H., von Caemmerer S. Carbon isotope discrimination as a diagnostic tool for C_4 photosynthesis in C_3 – C_4 intermediate species // Journal of Experimental Botany. 2016. V. 67. P. 3109. https://doi.org/10.1093/jxb/erv555
8. Nakamura N., Iwano M., Havaux M., Yokota A., Munekage Y.N. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C photosynthesis in the genus Flaveria // New Phytologist. 2013. V. 199. P. 832. https://doi.org/10.1111/nph.12296
9. Freitag H., Kadereit G. C_3 and C_4 leaf anatomy types in Camphorosmeae (Camphorosmoideae, Chenopodiaceae) // Plant Systematics and Evolution. 2014. V. 300. I. 4. P. 665. https://doi.org/10.1007/s00606-013-0912-9
10. Мокроносов А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука, 1981. с. 195.
11. Lundgren M.R., Besnard G., Ripley B.S., Lehmann C.E.R., Chatelet D.S., Kynast R.G., Namaganda M., Vorontsova M.S., Hall R.C., Elia J., Osborne C.P., Christin P.A. Photosynthetic innovation broadens the niche within a single species // Ecology Letters. 2015. V. 18. P. 1021. https://doi.org/10.1111/ele.12484
12. Shuyskaya E., Rakhmankulova Z., Voronin P., Kuznetsova N., Biktimerova G., Usmanov I. Salt and osmotic stress tolerance of the C_3 – C_4 xero-halophyte *Bassia sedoides* from two populations differ in productivity and genetic polymorphism // Acta Physiologiae Plantarum. 2015. 37:236. https://doi.org/10.1007/s11738-015-1981-x
13. Рахманкулова З.Ф., Шуйская Е.В., Суюндуков Я.Т., Усманов И.Ю., Воронин П.Ю. Различия в устойчивости к осмотическому и ионному фактору солевого стресса двух экотипов C_3 – C_4 ксерогалофита *Bassia sedoides* // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 372.
14. Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // Int J Genomics. 2014. V. 2014. Article ID 701596. https://doi.org/10.1155/2014/701596
15. Kirchhoff H. Chloroplast ultrastructure in plants // New Phytologist. 2019. V. 223. I. 2. P. 565. https://doi.org/10.1111/nph.15730
16. Kondadi A.K., Anand R., Reichert A.S. Functional Interplay between Cristae Biogenesis, Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial DNA Integrity // Int J Mol Sci. 2019. V. 20. P. 4311. https://doi.org/10.3390/ijms20174311
17. Bose J., Munns R., Shabala S., Gilliam M., Pogson B., Tyerman S.D. Chloroplast function and ion regulation in plants growing on saline soils: lessons from halophytes // J Exp Bot. 2017. V. 68. P. 3129. https://doi.org/10.1093/jxb/erx142
18. Hasan R., Ohnuki Y., Kawasaki M., Taniguchi M., Miyake H. Differential sensitivity of chloroplasts in mesophyll and bundle sheath cells in maize, an NADP-malic enzyme-type C_4 plant, to salinity stress // Plant Pro-

- duction Science. 2005. V. 8. P. 567.
<https://doi.org/10.1626/pps.8.567>
19. *Mitsuya S., Kawasaki M., Taniguchi M., Miyake H.* Light Dependency of Salinity-Induced Chloroplast Degradation // *Plant Production Science*. 2003. V. 6. P. 219.
<https://doi.org/10.1626/pps.6.219>
 20. *Yamane K., Oi T., Enomoto S., Nakao T., Arai S., Miyake H., Taniguchi M.* Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress // *Plant Cell Environ.* 2018. V. 41. P. 563.
<https://doi.org/10.1111/pce.13115>
 21. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: Полеспечат, 1989. 150 с.
 22. *Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.* POPGEN, version 1.32. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta/CIFOR, Edmonton. 1999.
 23. Балнокин Ю.В., Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Мясо-едев Н.А., Юсуфов А.Г. Пиноцитоз в клетках корня соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* и его возможное участие в транспорте ионов Cl^- // *Физиология растений*. 2007. Т. 54. С. 892.
 24. Мокроносов А.Т. Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата // Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата. Свердловск: изд-во Уральск. гос. ун-та, 1978. С. 5.
 25. *Griffiths H., Weller G., Toy L.F., Dennis R.J.* You're sove in: bundle sheath physiology, phylogeny and evolution in C3 and C4 plants // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 249.
 26. *Wang P., Khoshravesh R., Karki S., Tapia R., Balahadia C., Bandyopadhyay A., Quick W. L., Furbank R., Sage T.L., Langdale J.* Re-creation of a key step in the evolutionary switch from C₃ to C₄ leaf anatomy // *Current Biology*. 2017. V. 27. P. 3278.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.040>
 27. *Osborne C.P., Sack L.* Evolution of C₄ plants: a new hypothesis for an interaction of CO₂ and water relations mediated by plant hydraulics // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2012. V. 367. P. 583.
 28. *Gowik U., Westhoff P.* The path from C₃ to C₄ photosynthesis // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 56.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.165308>
 29. *Muhaidat R., Sage T.L., Frohlich M.W., Dangler N.G., Sage R.F.* Characterization of C₃-C₄ intermediate species in the genus *Heliotropium* L. (Boraginaceae): anatomy, ultrastructure and enzyme activity // *Plant Cell Environ.* 2011. V. 34. P. 1723.
 30. *Manaa A., Goussi R., Derbali W., Cantamessa S., Abdely C., Barbato R.* Salinity tolerance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) as assessed by chloroplast ultrastructure and photosynthetic performance // *Environmental and Experimental Botany*. 2019. V. 162. P. 103.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.012>