

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИНОК ЛЬНА-ДОЛГУНЦА ПРИ ТОРМОЖЕНИИ ТРАНСПОРТА АССИМИЛЯТОВ АНИОНОМ НИТРАТА

© Ф. А. Абдрахимов, С. Н. Баташева, Г. Г. Бакирова, В. И. Чиков¹

Институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, Казань;

¹ электронный адрес: chikov@kzn.ru

Изучали изменение ультраструктуры клеток мезофилла листовых пластинок льна-долгунца *Linum usitatissimum* L. при введении в апопласт нитрата калия. Обнаружено, что через 30 мин после начала введения в транскрипционный ток соли нитрата наблюдаются набухание и просветление митохондрий и микротел, закручивание дисков диктиосом в кольцевые структуры. Эти эффекты были характерны для симпластного домена, образованного клетками мезофилла, обкладки пучка и флоэмной паренхимы и не выявлялись в комплексе «ситовидные элементы—сопровождающие клетки». Параллельно в клетках-спутниках отмечен процесс образования крупной центральной вакуоли. Восстановление структуры органелл через 1—2 ч в ассимилирующих клетках и околопучковой паренхиме проходило на фоне усиления морфологических изменений в члениках флоэмы и клетках-спутниках и сопровождалось появлением признаков плазмолитиза в клетках мезофилла. Предположили, что двухфазный характер изменений ультраструктуры органелл листа и фотосинтеза может отражать двойственность ответной реакции клеток листа на анион нитрата. Быстрые альтерации структуры могут быть сопряжены с прямым влиянием аниона на метаболизм клеток и(или) сигнально-регуляторной функцией окисленных форм азота, а более медленные отражают результат торможения анионом оттока фотоассимилятов из листа.

Ключевые слова: ультраструктура, фотосинтез, транспорт ассимилятов, сосудистые пучки, нитраты.

Принятые сокращения: КСФ — клетка-спутник флоэмы, ПО — паренхимная обкладка, СЭФ — ситовидный элемент флоэмы, ТЭ — трахеальный элемент, ФП — флоэмная паренхима, ЭС — эндоплазматическая сеть, NR — нитратредуктаза.

Известно, что при повышенном азотном питании растений часто наблюдаются негативные явления, выражающиеся в подавлении фотосинтеза и нарушении транспорта ассимилятов из листа (Чиков, 1987). Ранее было показано, что при прямом введении в апопласт солей, содержащих нитрат-анион, ингибирование поглощения CO₂ происходит на фоне увеличения в листе-доноре концентрации меченых продуктов фотосинтеза и изменения соотношения сахарозы и гексозы (Баташева и др., 2007). При этом, по данным радиоавтографии, ассимиляты накапливались между крупными жилками листа. Механизм обнаруженного прямого подавления нитратами эвакуации продуктов фотосинтеза не зависел от сопутствующего катиона и остается пока неясным (Баташева и др., 2006).

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что модуляция транспортных процессов листа факторами различной природы (температура, осмотики, затенение и т. д.) сопряжена с существенными ультраструктурными изменениями клеток проводящей системы как симпластных, так и апопластных растений (Гамалей, Пахомова, 1981; Гамалей, 2004, 2007).

Поскольку изучение структуры проводящей системы при торможении экспорта ассимилятов из листа окисленными формами азота ранее никем не проводилось, мы

изучили динамику изменения ультраструктуры листьев-доноров в растениях льна при введении с транспирационным током в апопластное пространство аниона нитрата.

Материал и методика

Объектом исследований служил лен-долгунец *Linum usitatissimum* L. сорта Новоторжский в фазе быстрого роста. В этот период растение формирует многочисленные равнозначные завершившие рост листья-доноры ассимилятов и мощный акцептор продуктов фотосинтеза — верхнюю часть побега, растущую со скоростью до 4 см/сут (Кошелева, 1980). В срезанные побеги длиной 50 см с помощью специальной установки под давлением 10⁴ Па вводили 50 мМ раствор KNO₃. Нитрат калия был избран в связи с тем, что *in vivo* именно калий транспортирует нитрат-ион из листьев в корни. Ранее было нами показано, что сопутствующий нитрату катион не играет существенной роли в изменении химизма фотосинтеза и оттока ассимилятов (Chikov, Bakirova, 1999; Баташева и др., 2006). Условия выращивания растений и способ введения нитрата в стебель описаны в работе Баташевой с коллегами (2007). Пробы отбирали из донорной части побега через

30 мин, 1 и 2 ч после начала инфильтрации в ксилему раствора нитрата.

Для характеристики ответной реакции фотосинтеза на введение нитрата в апопласт измеряли динамику фотосинтетического газообмена верхней части опытного побега (21 см). Газометрическая установка состояла из инфракрасного газоанализатора URAS-2T (Германия) и системы стабилизации концентрации и скорости потока газовой смеси, аналогичной описанной ранее (Чиков и др., 1982). Регистрацию фотосинтетического газообмена начинали сразу после начала введения в побег раствора нитрата (0.5 или 1.5 %). Измерения продолжали в течение 2.5—3.0 ч путем многократных замеров реакции фотосинтетического объекта на включение и выключение света. Измерения проводили при искусственном освещении от ЛЭТИ (освещенность 80 клк).

Для электронно-микроскопического исследования выскочки из средней части листьев, взятых на расстоянии 25 см от верхушки побега, фиксировали в течение 12 ч в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) и постфиксировали 2 ч в 1%-ном OsO_4 на том же буфере с добавлением сахарозы (34 мг/мл). Выскочки дегидратировали в растворах ацетона возрастающей концентрации (30—100 %) с последующим замещением ацетона окисью пропилена (в течение 45 мин). Образцы пропитывали эпоксидной смолой Эпон-812 (Германия) и полимеризовали при 37, 45 и 57 °С в течение 24 ч при каждой температуре. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на микротоме ЛКВ-III (Швеция), контрастировали раствором уранил-ацетата (Tander, 1990) и цитратом свинца (Reynolds, 1963). Образцы просматривали в оптическом микроскопе NU-2 (Германия) и в электронном микроскопе JEM-1200 EX (Германия).

Эксперименты проводили в 3-кратной биологической повторности.

Результаты

Ассимилирующие клетки мезофилла листа слабо дифференцированы на губчатую и столбчатую паренхимы (рис. 1, а). Проводящая система листовой пластинки льна-долгунца образована тремя крупными жилками, одна из которых центральная, и ветвящейся сетью мелких жилок более высоких порядков. Мелкие жилки на поперечных срезах (рис. 1, б) сформированы 5—6 клетками паренхимной обкладки (ПО), 2—4 трахеальными элементами (ТЭ) и ситовидными элементами флоэмы (СЭФ), их клетками-спутниками (КСФ) и клетками флоэмной паренхимы (ФП).

При инфильтрации дистиллированной H_2O (контроль) растения на протяжении всего опыта (в пределах ошибки среднего) сохраняли исходные темпы светового поглощения CO_2 (рис. 2) и стабильную ультратонкую организацию клеток как ассимилирующей паренхимы, так и клеток мелких жилок проводящей системы (рис. 3). Флоэмные элементы у льна ассоциированы с клетками-спутниками закрытого типа (transfer cells) (рис. 3, а, б). Апопластный лабиринт последних хорошо развит, и его гребни проникают на глубину до 1.5 мкм в субкортекс клеток (рис. 3, б). Сами клетки вакуолизованы слабо, их цитоплазма осмиофильна, обильно насыщена рибосомами и митохондриями. Митохондрии умеренно конденсированы и содержат многочисленные кристы (рис. 3, б). Для

клеток характерно присутствие слегка деформированного по контуру ядра и пластид. Хлоропласты гранального типа часто амебодны по форме, содержат осмиофильные пластоглобулы, элементы периферического ретикула и характеризуются полным отсутствием крахмальных зерен. Полость ситовидных трубок контрольных растений не содержит включений (рис. 3, з). СЭФ имеют единичные мелкие конденсированные митохондрии и тонкий слой фибриллярного материала, примыкающего к пограничной мембране. Клетки ФП бедны органеллами (рис. 3, а, в). Их гиалоплазма электронно-прозрачна, содержит немногочисленные мелкие пластыды, митохондрии и цистерны эндоплазматической сети (ЭС). Вакуоль часто заполнена мелкими везикулами. Во всех клетках пучка микротела, как правило, не выявлялись.

По своей общей организации, набору и морфологии органелл клетки околопучковой паренхимы аналогичны окружающим клеткам ассимилирующей паренхимы, но отличались формой и расположением органелл. Их ядра, митохондрии, микротела и плосковыпуклые хлоропласты с линзовидными зернами крахмала занимали центрифугальное положение в цилиндрических клетках, ориентированных длинной осью вдоль пучка (рис. 1, б).

Ассимилирующие клетки мезофилла контрольных растений по своей структуре были типичными для растений, выросших в благоприятных условиях. Они характеризовались овальными ядрами с немногочисленными периферийно расположенными участками гетерохроматина, хлоропластами с хорошо развитой системой фотосинтетических мембран и обильно насыщенными крахмальными зернами, а также овальными ортодоксальными митохондриями и крупными пероксисомами (рис. 3, д, е).

Как следствие введения в апопласт раствора нитрата калия наблюдали двухфазную реакцию изменения газообмена побегов льна-долгунца (рис. 2) и ультраструктуры листовых пластинок (рис. 4—6).

В течение 1-го ч выявлялась реакция стимуляции поглощения CO_2 , которая сменялась его подавлением (рис. 2). Увеличение концентрации аниона до 150 мМ кардинально не повлияло на характер ответной реакции, но сказывалось на скорости и амплитуде изменений газообмена.

Введение в транспирационный ток нитрата вызывало существенные изменения в организации ряда органелл клеток мезофилла (рис. 4, 5), которые выражались в просветлении матрикса митохондрий и редукции в них крист (рис. 4). Эффект был максимален в ФП и обкладке пучков (рис. 4, б, в; 5, з), менее выражен в мезофилльных клетках (рис. 4, а; 5, д) и отсутствовал в клетках-спутниках (рис. 4; 5, б). Параллельно в мезофилле и околопучковой паренхиме наблюдали набухание микротел и просветление их матрикса (рис. 5, д) и закручивание диктиосом и цистерн ЭС в кольцевые структуры (рис. 5, е, ж). На срезах такие элементы комплекса Гольджи имели подковообразную форму (рис. 5, е). Одновременно в клетках-спутниках отмечали увеличение размеров центральной вакуоли (рис. 5, а, б). Содержавшиеся в полости вакуоли мультивезикулярные структуры, как правило, формировались на вакуолярной мембране, а заполнявшие ее везикулы — на границе тонопласта и цитоплазмы (рис. 5, б), вследствие чего структуры были ограничены одной мембраной — тонопластом. Полость СЭФ в этот период оставалась электронно-прозрачной, но количество формирующихся на границе клеток везикул увеличивалось (рис. 5, з).

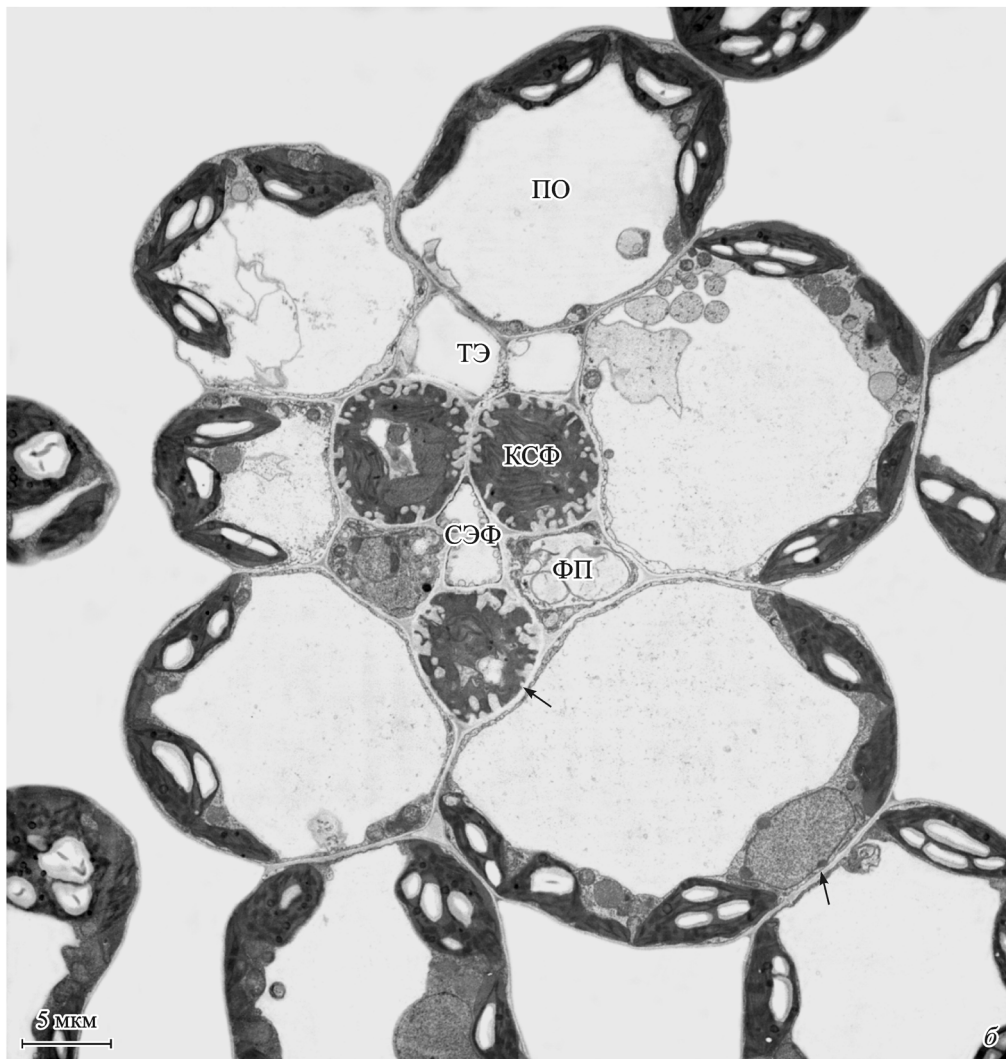
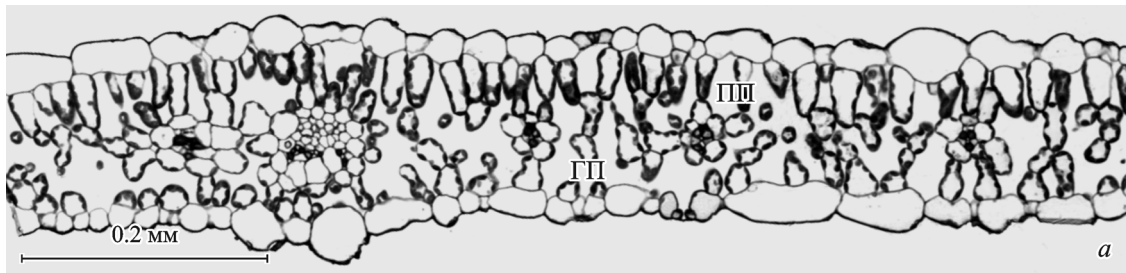


Рис. 1. Анатомическая организация листовой пластинки (а) и мелкого пучка (б) льна-долгунца.

а — дифференцировка на палисадную и губчатую паренхимы выражена слабо; б — мелкие жилки, на поперечных срезах сформированы 5—6 клетками паренхимной обкладки, 2—4 сосудами ксилемы и ситовидными элементами флоэмы, а также клетками-спутниками и клетками флоэмной паренхимы; стрелки — пути разгрузки сосудов ксилемы. ГП — губчатая паренхима, ПО — паренхимная обкладка, ПП — палисадная паренхима, ТЭ — трахеальный элемент, СЭФ — ситовидный элемент флоэмы, КСФ — клетка-спутник флоэмы, ФП — флоэмная паренхима.

Через 1 ч после начала воздействия вакуоли в клетках-спутниках продолжали увеличиваться в размерах, а их полости заполнялись мембраноограниченными структурами (рис. 6, а). В этот период границы вакуолей достигали вершин гребней клеточной стенки (рис. 6, б, в), где и формировались везикулы, покрытые двумя мембранами. Одна из них — внешняя — была вакуолярной, а внутренняя — плазматической (рис. 6, в). Внутренняя полость структуры содержала, по-видимому, вещество апопласта, включая фибриллы, мембраноограниченные трубчатые и округлые структуры (рис. 6, в). В этот период полость

СЭФ заполнялась многочисленными мелкими пузырьками (рис. 6, з). Митохондрии, пероксисомы и диктиосомы мезофилла, обкладки и флоэмной паренхимы репарировали по своей организации до контрольного уровня (рис. 4; 6, д—ж). В целом такая морфология органелл домена, состоящего из ассимилирующих клеток, околопучковой и флоэмной паренхимы, сохранялась и в течение 2-го ч (рис. 7, а, в, з). Иногда в клетках околопучковой паренхимы выявлялся процесс разрыва оболочек пластид. При этом крахмальная капсула замыкалась на экстрапластидное пространство (рис. 7, д). Ко 2-му ч плотность ци-

тозоля ФП существенно возрастала (рис. 7, в), а в ассимилирующих клетках усилились признаки плазмоллиза содержимого (рис. 7, ж) и наблюдалось набухание межмембранных пространств тилакоидов хлоропластов (рис. 7, е). В клетках-спутниках вакуоль предельно увеличивалась, а цитозоль максимально конденсировалась (рис. 7, а, б). Создавалось впечатление, что в отдельных случаях мембраны тонопласта и плазмалеммы в этих клетках смыкались и содержимое апопласта начинало прямо контактировать с вакуолярным (рис. 7, б, стрелка).

Учитывая, что вышеописанные структурные альтерации в наших опытах могут являться следствием осмотических изменений в ткани, мы использовали характеристику, отражающую такие изменения. Известно, что все биологические структуры, покрытые полупроницаемыми мембранами, включая саму клетку, являются чувствительными осмометрами. Наиболее лабильными из внутриклеточных органелл являются митохондрии. Кратковременные изменения организации и объема этих органелл сложны по своей природе. Изменения осмотического давления среды, проницаемости оболочки, например при индукции апоптоза и функциональной активности самих митохондрий, приводят к изменению линейных размеров этих органелл (Машанский, Рабинович, 1987; Logan, 2006). Принимая во внимание, что в клетках-спутниках закрытого типа митохондриион может быть представлен ретикулярными формами (Гамалей, Пахомова, 1981), мы использовали в качестве критерия изменения объема хондриома изменение короткой оси органелл (см. таблицу).

Полученные данные свидетельствуют о том, что через 30 мин после начала введения в транспирационный ток нитрата в домене, образованном ассимилирующей околопучковой и флоэмной паренхимой, органеллы набухали (их короткие оси составляли соответственно 113, 132 и 159 % от контроля), а в комплексе «СЭФ—спутники» сжимались до 82 % от контроля (см. таблицу). Через 1—2 ч в первом домене увеличение объема сменилось сжатием органелл. При этом величины изучаемых параметров митохондрий клеток, входящих в состав пучков (обкладка и флоэмная паренхима), достигали контрольных значений, а входящих в состав ассимилирующей паренхимы составляли 80 % от контрольных значений (см. таблицу). Уменьшение размера хондриома клеток спутников через 1—2 ч продолжилось, но было незначительным (см. таблицу).

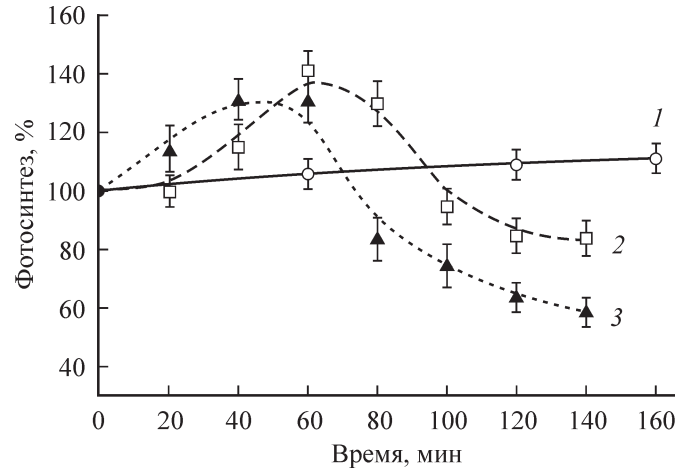


Рис. 2. Динамика изменения фотосинтеза при введении в побег льна-долгунца воды (1, контроль) и растворов нитрата калия в концентрациях 50 (2) и 150 (3) мМ.

1 — при инфильтрации в апопласт побега воды нет роста поглощения CO_2 ; 2 — двухфазная реакция изменения газообмена при введении в апопласт 50 мМ KNO_3 существенно не влияло на характер реакции, но влияло на скорость и амплитуду изменений газообмена. Фотосинтез указан в % от контрольных значений.

Обсуждение

Согласно морфологическим признакам терминали пучков (рис. 1, б) растения льна-долгунца (сем. Linaceae, пор. Geraniales) относятся к апопластному продвинутому (2В) типу (Гамалей, 2004). Ранее было обнаружено (Баташева и др., 2007), что при введении с транспирационным током в апопласт листа нитратов изменяются биохимические характеристики темновой фазы фотосинтеза и ингибируется отток продуктов фотосинтеза. Механизм этого ингибирования остается пока не выясненным. Предварительные изучения ультраструктуры клеток мелких жилок листа свидетельствовали о том, что в клетках проводящей системы происходят существенные изменения, которые могут являться выражением ингибирующего влияния нитратов на транспорт ассимилятов.

Очевидно, что изменения структуры клеток при действии нитрата представляют собой комбинацию быстрых изменений, являющихся следствием как прямого влияния аниона на метаболизм клеток, так и вторичных изменений, возникающих, например, при увеличении осмотиче-

Изменение короткой оси митохондрий в клетках листовых пластинок льна-долгунца при введении в транспирационный ток 50 мМ раствора KNO_3

Короткая ось митохондрий (мкм) в клетках	Контроль	Через 30 мин	Через 1 ч	Через 2 ч
Фотосинтезирующей паренхимы	0.62 ± 0.02	0.70 ± 0.02^a	0.50 ± 0.03^a	0.52 ± 0.01^a
Обкладка пучков	0.53 ± 0.02	0.70 ± 0.03^a	0.48 ± 0.02	0.50 ± 0.02
Флоэмной паренхимы	0.41 ± 0.02	0.65 ± 0.02^a	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.02
Спутниках	0.64 ± 0.01	0.53 ± 0.02^a	0.49 ± 0.01^a	0.49 ± 0.01^a
Ситовидных элементов	0.35 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.36 ± 0.02	—

Примечание. Даны средние значения короткой оси митохондрий и ошибка среднего. ^a Достоверно отличается от контроля при $P < 0.05$. Число измеренных митохондрий в клетках ситовидных элементов и флоэмной паренхимы составляет 30—40, в других клетках — 50.

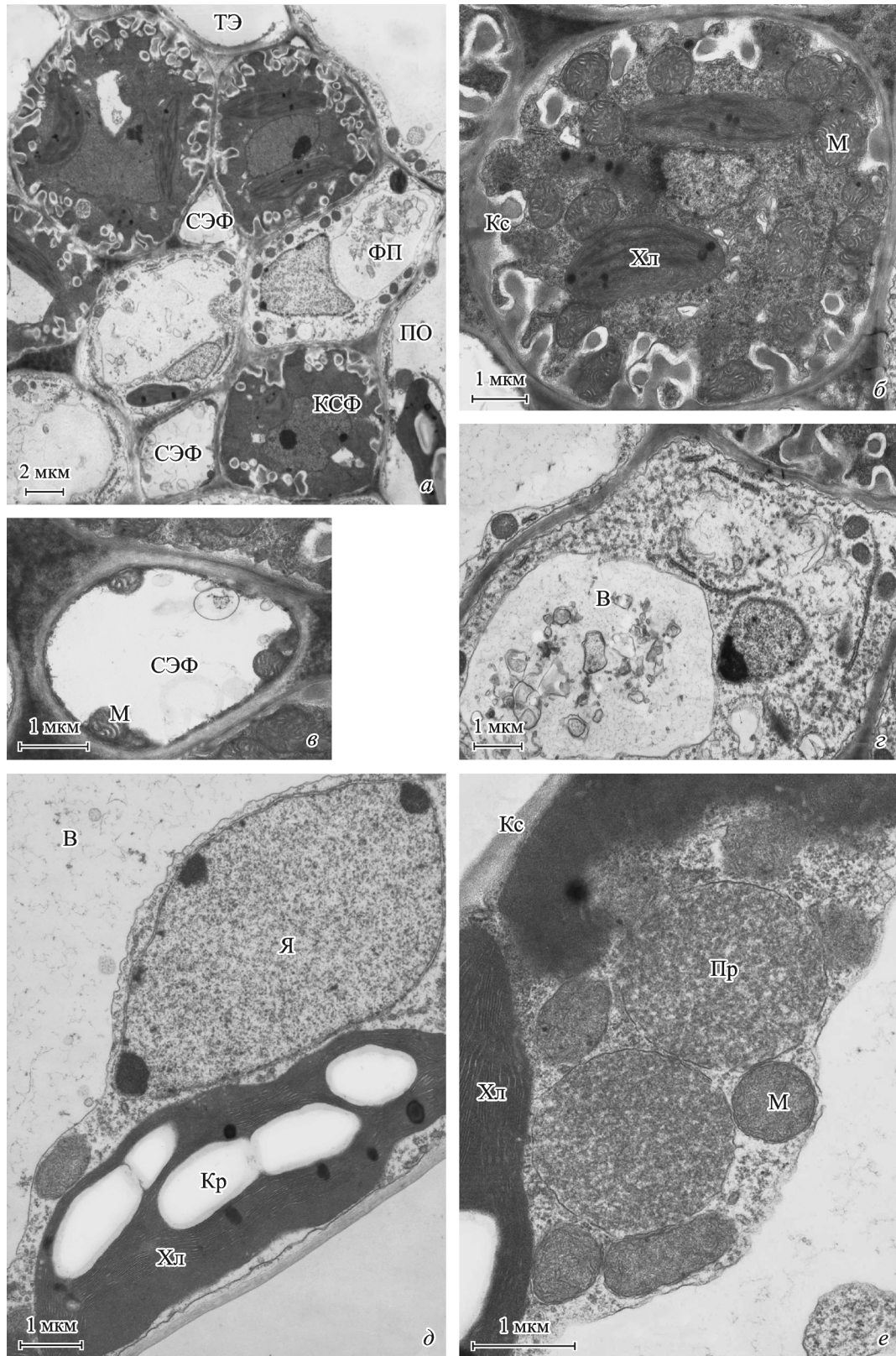


Рис. 3. Ультратонкая организация клеток мелких жилок (*a—g*) и клеток мезофилла (*d, e*) листовых пластинок льна-долгунца контрольного варианта (введение воды).

a, b — флоэмные элементы у льна ассоциированы с клетками-спутниками закрытого типа (transfer cells), апопластный лабиринт хорошо развит, цитоплазма осмиофильна, обильно насыщена рибосомами и митохондриями, полость ситовидных трубок электронно-прозрачна и содержит единичные мелкие конденсированные митохондрии; клетки флоэмной паренхимы бедны органеллами (*a, g*); *d, e* — организация ассимилирующих клеток мезофилла типична для мезофитных C_3 -растений. В — вакуоль, Кр — крахмал, Кс — клеточная стенка, М — митохондрия, ПО — паренхимная обкладка, Пр — пероксисома, ТЭ — трахеальный элемент, СЭФ — ситовидный элемент флоэмы, Хл — хлоропласт, КСФ — клетка-спутник флоэмы, ФП — флоэмная паренхима, Я — ядро.

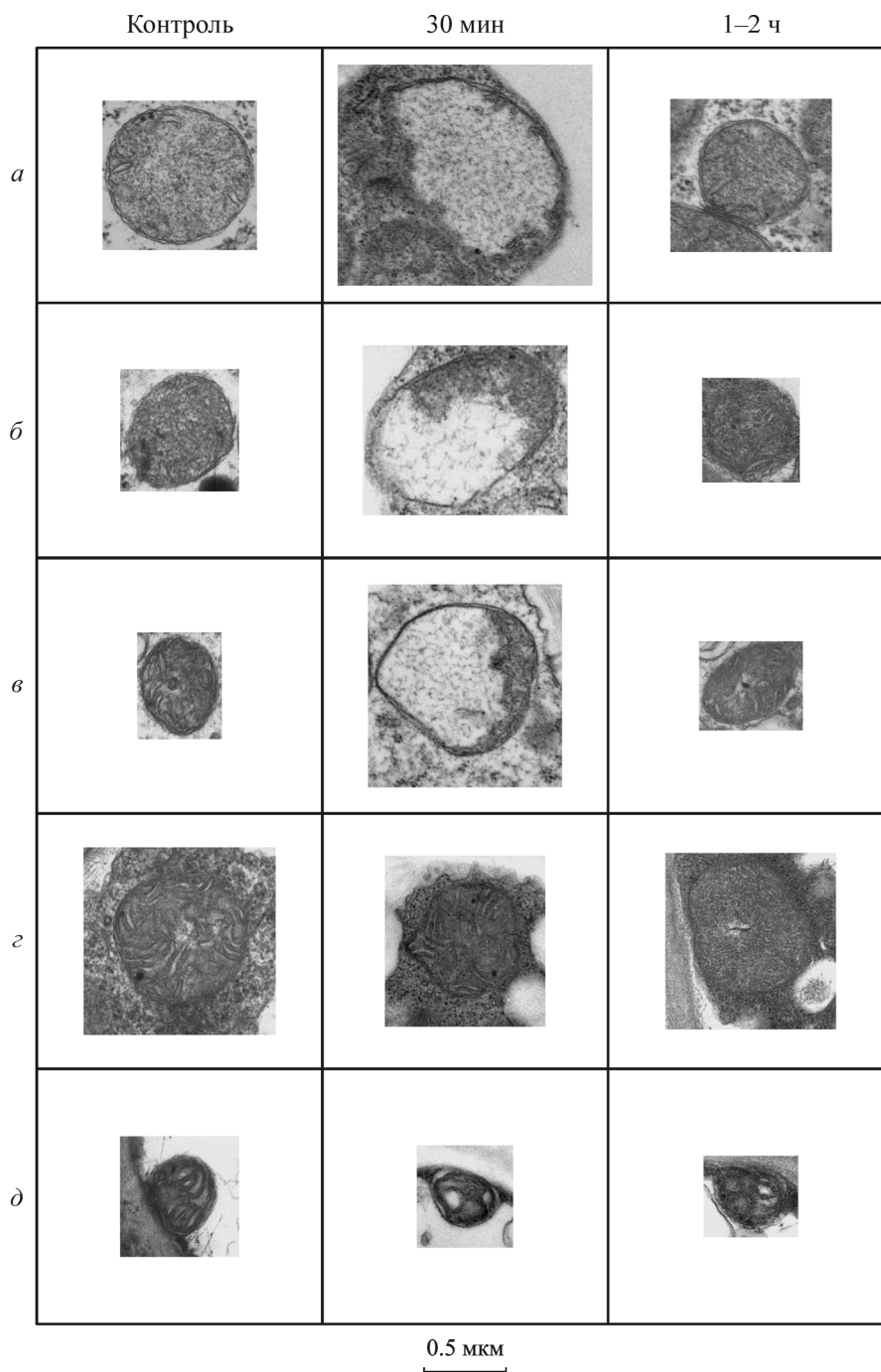


Рис. 4. Влияние нитрата калия на ультратонкую организацию митохондрий листовых пластинок льна-долгунца.

a — клетки ассимилирующей паренхимы, *б* — клетки околоручковой паренхимы, *в* — клетки флоэмной паренхимы, *г* — клетки-спутники, *д* — ситовидные элементы. Через 30 мин после начала введения в транспирационный ток нитрата элементы хондриома симпластного домена «фотосинтезирующие клетки—околоручковая паренхима—флоэмная паренхима» набухали с просветлением матрикса оргanelл; через 1–2 ч их структура возвращалась к норме; реакция митохондрий клеток-спутников и ситовидных элементов выражена слабо.

ского давления апопласта и цитозоля в результате торможения оттока ассимилятов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что реакция фотосинтеза и ультраструктуры листьев-доноров на нитрат калия в наших опытах имеет как минимум 2 фазы. Рассмотрим первую фазу. Она протекает в пределах 1 ч и характеризуется повышением темпов поглощения CO₂ и существенными изменениями морфологии оргanelл клеток обоих мезофилльных симпластных доменов.

В комплексе клеток, образованном ассимилирующей, околоручковой и флоэмной паренхимами, изменения затрагивали большинство клеточных оргanelл. Они выражались в просветлении матрикса, закручивании цистерн ЭС и диктиосом в кольцевые структуры (рис. 4, 5). Эффект был максимален в ФП и обкладке пучков и менее выражен в мезофилльных клетках (рис. 4; см. таблицу). Подобная ответная реакция хорошо согласуется с характером разгрузки сосудов ксилемы в апопластных растении-

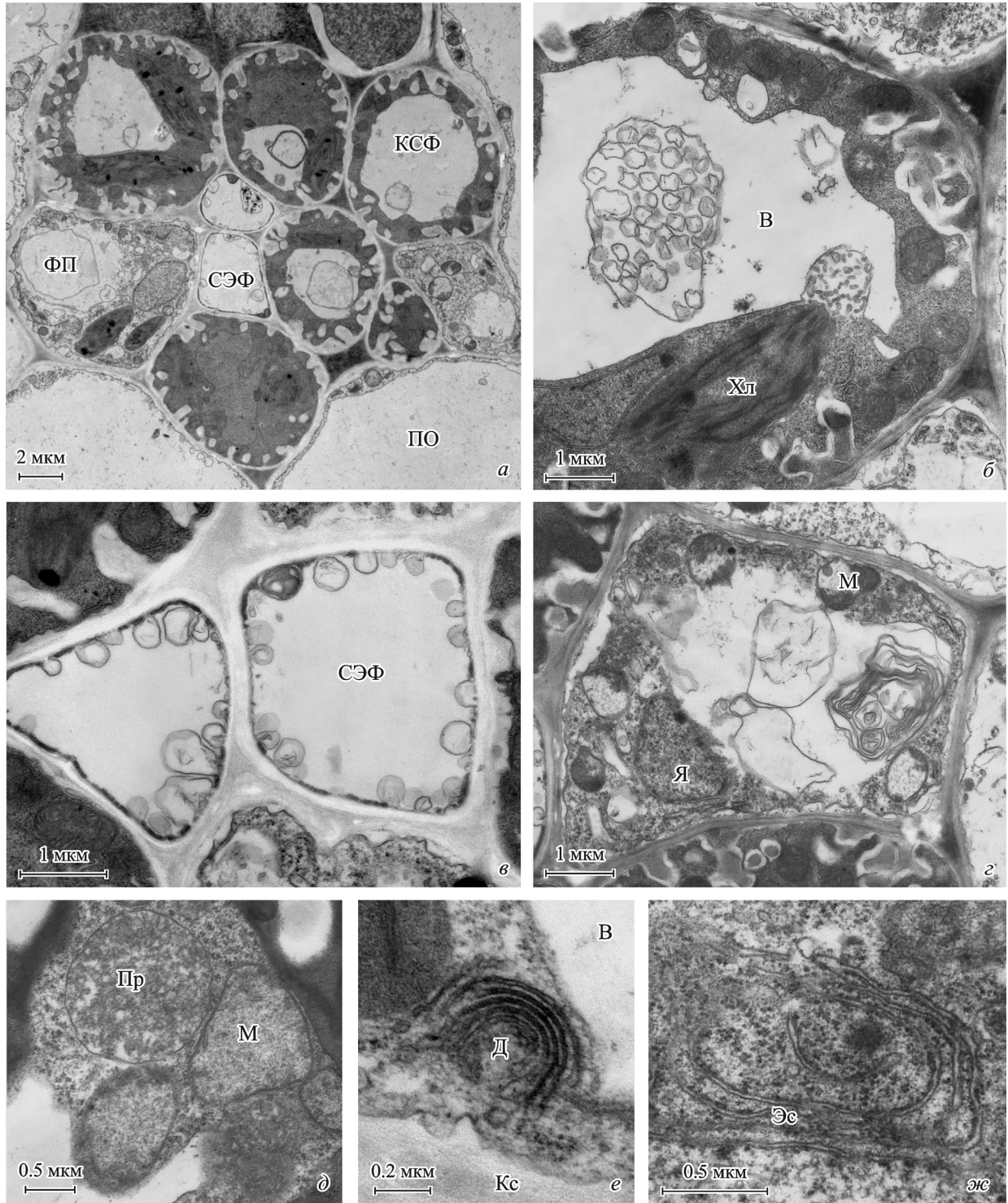


Рис. 5. Ультратонкая организация клеток листовых пластинок льна-долгунца через 30 мин после начала введения в транспирационный ток нитрата калия.

Нитрат индуцировал увеличение размеров центральной вакуоли в клетках-спутниках (а, б) и просветление матрикса митохондрий с редукцией в них крист; эффект альтерации хондриома был максимальен в клетках флоэмной паренхимы (г), отсутствовал в клетках-спутниках (б); полость СЭФ оставалась электронно-прозрачной, но количество формирующихся на границе клеток везикул увеличивалось (в); в мезофилле наблюдали набухание микротел с просветлением их матрикса (д) и закручивание диктиосом и цистерн ЭС в кольцевые структуры (е, ж). В — вакуоль, Д — диктиосома, Кс — клеточная стенка, М — митохондрия, ПО — паренхимная обкладка, Пр — пероксисома, СЭФ — ситовидный элемент флоэмы, Хл — хлоропласт, КСФ — клетка-спутник флоэмы, ФП — флоэмная паренхима. Эс — эндоплазматическая сеть, Я — ядро.

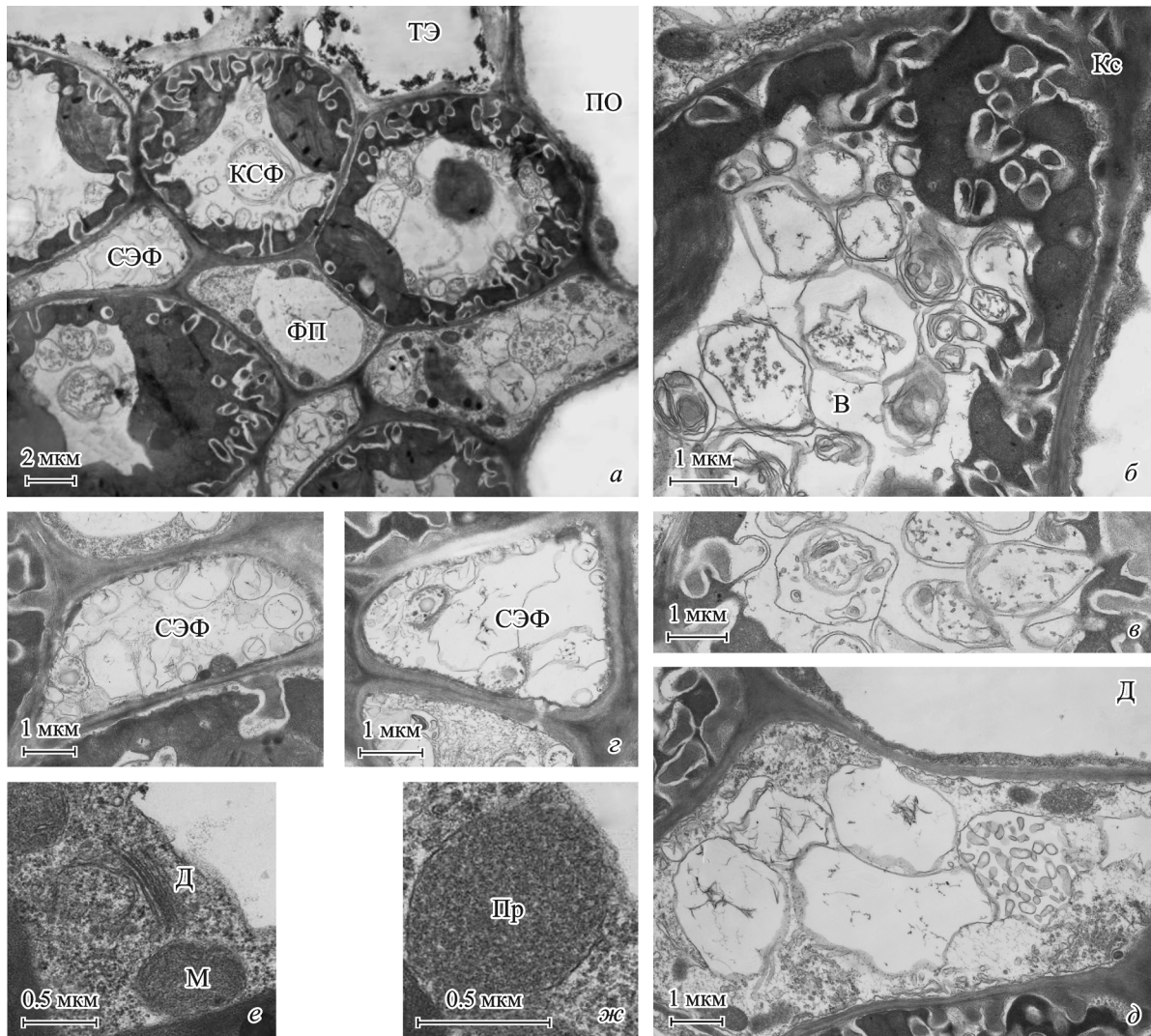


Рис. 6. Ультратонкая организация клеток листовых пластинок льна-долгунца через 1 ч после начала введения в транспирационный ток нитрата калия.

Вакуоли в клетках-спутниках продолжали увеличиваться в размерах, а их полости заполнялись мембраноограниченными структурами (а—в); границы вакуолей достигали вершин гребней клеточной стенки (б, в), где и формировались везикулы, покрытые двумя мембранами (в): внешней (вакуолярной) и внутренней (плазматической); полость СЭФ заполнялась многочисленными мелкими пузырьками (з); митохондрии, пероксисомы и диктиосомы мезофилла (е, ж), обкладки и флоэмной паренхимы (д) репарировали по своей организации до контрольного уровня. В — вакуоль, Д — диктиосома, Кс — клеточная стенка, М — митохондрия, ПО — паренхимная обкладка, Пр — пероксисома, ТЭ — трахеальный элемент, СЭФ — ситовидный элемент флоэмы, КСФ — клетка-спутник флоэмы, ФП — флоэмная паренхима, Я — ядро.

ях продвинутого типа. Показано (Гамалей, 2004), что в растениях с таким типом организации пучков разгрузка сосудов ксилемы проходит симпластно клетками обкладки пучка, а загрузка флоэмы — апопластно (рис. 1, б, обозначены *стрелками*). При трассировании потоков непосредственно после разгрузки ксилемы флуоресцентные маркеры обнаруживались сначала в клетках околопучковой и флоэмной паренхим, а в последующем — и в ассимилирующих клетках мезофилла. Именно такой градиент амплитуды ответной реакции клеток на анион и наблюдался в наших опытах (рис. 4).

Хорошо известно, что в растениях с апопластным способом загрузки флоэмы апопласт непрерывен и не разделен на субдомены специализированными структурами типа суберинизированных или лигнифицированных зон клеточной стенки. Осмомолярность используемого нами раствора KNO_3 (100 миллиосмоль) ниже осмотического давления протопласта клеток листа. Более того, у конт-

рольных растений, в которые вводилась дистиллированная вода, через 30 мин подобных изменений не выявлялось. Непрерывность апопласта означает, что его осмотическое давление должно стремиться к выравниванию между разными полюсами мезофилла (ассимилирующий—экспортирующий) и должно быть одинаковым на границах между доменами (ФП—ПО) и (КСФ—СЭФ). Прямо противоположная реакция органелл в этих клетках означает, что выявленные структурные изменения в первой фазе ответной реакции домена ассимилирующая клетка—обкладочная клетка—флоэмная паренхима, по-видимому, не являются осмотическими по своей природе. Это означает, что в этот начальный период воздействия мы имеем дело с прямым влиянием аниона нитрата на организацию клеток мезофилла.

А priori нитратный анион способен влиять на клеточные структуры как непосредственно, так и косвенно — через продукты неполного восстановления.

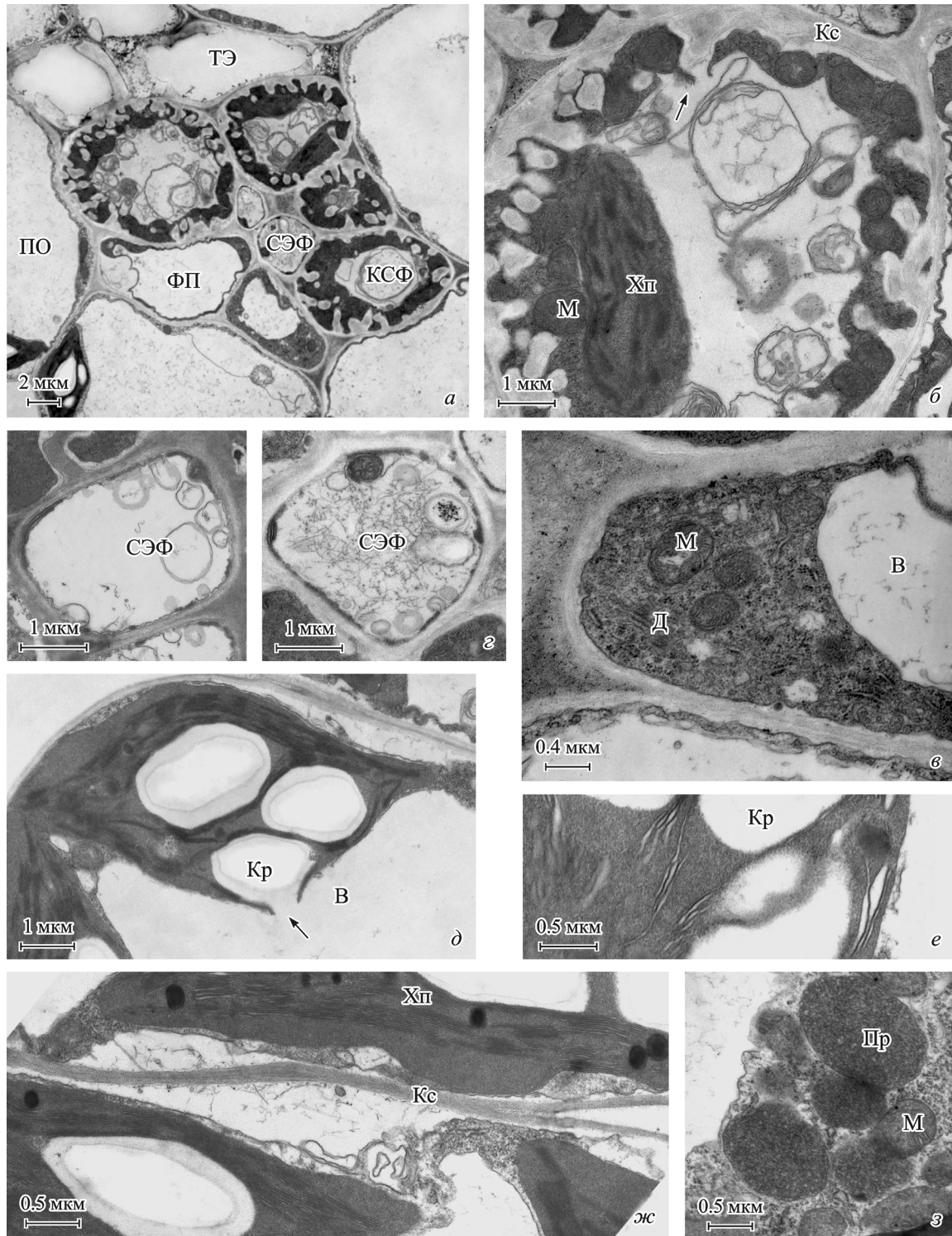


Рис. 7. Ультратонкая организация клеток листовых пластинок льна-долгунца через 2 ч после начала введения в транспирационный ток нитрата калия.

В целом морфология органелл домена «ассимилирующая—околопучковая—флоэмная паренхимы» аналогична таковой через 1 ч воздействия (а, в, з); в клетках усиливались признаки повышения осмотического давления; плотность цитозоля клеток флоэмной паренхимы существенно возрастала (в), а в ассимилирующих клетках наблюдали плазмолиз содержимого (ж) и набухание межмембранных пространств тилакоидов хлоропластов (е). В клетках околопучковой паренхимы выявлялся процесс разрыва оболочек пластид с замыканием пространства крахмальной капсулы на экстрапластидное (д). В полости СЭФ присутствовали многочисленные мелкие пузырьки и фибриллы (з). В клетках-спутниках вакуоль предельно увеличилась, а цитозоль максимально конденсировался (а, б). В отдельных случаях мембраны тонопласта и плазмалеммы смыкались (б, стрелка). В — вакуоль, Д — диктосома, Кр — крахмал, Кс — клеточная стенка, М — митохондрия, ПО — паренхимная обкладка, Пр — пероксисома, ТЭ — трахеальный элемент, СЭФ — ситовидный элемент флоэмы, Хп — хлоропласт, КСФ — клетка-спутник флоэмы, ФП — флоэмная паренхима.

Известно, что сам нитратный анион является не только субстратом ассимиляции, но и выполняет важную сигнальную роль (Crawford, Forde, 2002). В надземной части растений нитрат способен запускать ответные реакции как через индукцию образования в корнях физиологически активных веществ (например, цитокининов), так и прямо — в результате его транспорта по ксилеме (Walch-Liu et al., 2005). Все гены первичной ассимиляции азота прямо регулируются нитратным анионом. В тканях, в частности ассимилирующих, общая концентрация нитрата может достигать 10 мМ, но, как предполагается, поддерживается в самом цитозоле на уровне 5 мМ (Kaiser et al., 2000). Аналогичная концентрация аниона (5 мМ) выявлена и в ксилемном эксудате. Показано, что на уровне физиологии листа восстановление нитрата лимитировано уровнем восстановителя в цитозоле (Kaiser et al., 2000). При увеличении цитозольных концентраций нитрата в терминальных участках разгрузки ксилемы возможно образование продукта его неполного восстановления — окиси азота (NO) — летучего газа с высокой реакционной способностью.

Ключевым ферментом ассимиляции триоксида азота является нитратредуктаза (NR; EC 1.6.6.1). В настоящее время осознано, что у растений NR, вероятно, является основным источником образования NO (Meuer et al., 2005), который, как было показано за последние четверть века, является не только сигнальной молекулой (Тарчевский, 2002), но прямым регулятором активности ферментов (Lindermayr et al., 2005). В оптимальных условиях при ассимиляции нитрата цитоплазматическая NR катализирует восстановление нитрата в нитрит. Последний переносится в хлоропласты, где восстанавливается NR до NH_4^+ . При этом лимитирующим фактором скорости образования NO является концентрация нитрита в цитозоле (Planchet et al., 2005). Другими словами, при оптимальном азотном питании совместная локализация фермента и нитрата не достигает критических значений для генерации NO. В растительных клетках при избытке нитрита нитратредуктаза способна восстанавливать его далее до NO в результате одноэлектронного переноса, при этом количество образующегося NO заведомо превосходит нужды сигнализации (Meuer et al., 2005). Более того, в случае выхода нитрита в апопласт возможно его восстановление до NO и неэнзиматическим путем (Bethke et al., 2004). В естественных условиях выделение NO наблюдается в условиях стресса и в темноте, когда генерация ассимиляционной силы ингибирована или сильно подавлена. В наших опытах такая колокализация NR—нитрит, по-видимому, достигается искусственным путем, так как даже при иммобилизации NO_3^- в стебле его концентрация будет превышать характерную для ксилемы листа 5 мМ.

Помимо сигнальных функций NO представляет собой крайне реакционную молекулу, способную участвовать в свободнорадикальных реакциях. Более того, согласно данным протеомного анализа, около 52 белков подвергаются регуляции путем S-нитрозилирования (Lindermayr et al., 2005). Среди этих белков значительную долю составляют стресс-белки, цитоскелетные и метаболические белки, включая ферменты углеводного метаболизма. Учитывая триггерный характер реакций, запускаемых окисью азота, и множественность мишеней действия, становится понятным широкий спектр действия окисленных форм азота на митохондрии, пероксисомы, диктиосомы и переходящий характер наблюдаемых нами изменений. Растения имеют множественные механизмы для избегания ток-

сического влияния накопления нитрита в ткани. Один из них — переключение использования ассимиляционной силы с поглощения CO_2 на восстановление нитрита, сопряженное со снижением темпов ассимиляции и переключением направленности фотосинтеза на неуглеводную, что многократно наблюдалось в наших экспериментах (Чиков, 1987).

В контексте торможения нитратом оттока ассимилятов все изменения второй фазы представляются логичными. Подавление фотосинтеза при ингибировании оттока проходит по механизму обратной связи (Чиков, 1987) и сопровождается набуханием межмембранных пространств тилакоидов. Сжатие органелл в обоих доменах является осмотическим и может отражать торможение транспорта сахарозы из листа (Баташева и др., 2007). У апопластных растений независимо от способа блокады оттока ассимилятов концентрация сахаров апопласта может повышаться почти в 2 раза (Voitsekhovskaja, 2002). В этот период, если судить по плотности цитозоля и органеллы, протопласты клеток зоны пучков максимально обезвожены (рис. 7, а—в). Представляется интересным, что именно на этом фоне наблюдаются разрывы мембран клеток-спутников у гребней лабиринта и внутренней полости крахмальных капсул у хлоропластов в клетках обкладки сосудистых пучков. Последнее явление характерно для пшеницы в период налива зерна, когда концентрация свободных сахаров в клетке возрастает (Repka et al., 1981). Совокупность выявленных нами изменений ультраструктуры клеток-спутников флоэмы во второй фазе влияния нитратного аниона практически полностью соответствует наблюдавшимся ранее при блокировании оттока ассимилятов у апопластных растений (Гамалей, 2004).

На основе полученных данных можно предположить, что двухфазный характер изменения фотосинтеза и ультраструктуры органелл листа отражает двойственность ответной реакции клеток листа на увеличение концентрации аниона нитрата. Быстрые структурно-функциональные альтерации могут быть сопряжены с прямым влиянием аниона на метаболизм клеток и(или) сигнально-регуляторной функцией окисленных форм азота, а более медленные развиваются в результате торможения анионом оттока фотоассимилятов из листа.

Список литературы

- Баташева С. Н., Абдрахимов Ф. А., Бакирова Г. Г., Чиков В. И. 2007. Влияние нитратов, вводимых с транспирационным током воды, на транспорт ассимилятов. Физиол. раст. 54 (3) : 421—431.
- Баташева С. Н., Авакумов Ю., Бакирова Г. Г., Булдаков В. С., Чиков В. И. 2006. Влияние нитратов, вводимых в апопласт растения с транспирационным током воды, на фотосинтетический метаболизм углерода. Вестн. Харьков. нац. аграрного ун-та. Сер. биол. 2 (9) : 43—49.
- Гамалей Ю. В., Пахомова М. В. 1981. Структура клеток-спутников флоэмы листа. Результаты объемной реконструкции. Цитология. 23 (2) : 117—129.
- Гамалей Ю. П. 2004. Транспортная система сосудистых растений. СПб.: Изд-во С.-Петербурга. 424 с.
- Гамалей Ю. П. 2007. Роль тонопласта клеток мезофилла в определении русла загрузки флоэмы. К 30-летию исследований загрузки флоэмы. Физиол. раст. 54 (1) : 5—14.
- Кошелева Л. Л. 1980. Физиология питания и продуктивности льна-долгунца. Минск: Наука и техника. 200 с.
- Машанский В. Ф., Рабинович И. М. 1987. Ранние реакции клеточных органоидов. Л.: Наука. 120 с.

Тарчевский И. А. 2002. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука. 294 с.

Чиков В. И. 1987. Фотосинтез и транспорт ассимилятов. М.: Наука. 188 с.

Чиков В. И., Яргунов В. Г., Федосеева Э. З., Чемикосова С. Б. 1982. Влияние соотношения между производством и потреблением ассимилятов на функционирование фотосинтетического аппарата растений. Физиол. раст. 29 (6): 1141—1146.

Bethke P. C., Badger M. R., Jones R. L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. Plant Cell. 16: 332—341.

Chikov V., Bakirova G. 1999. Relationship between carbon and nitrogen metabolism in photosynthesis. The role of photooxidation processes. Photosynthetica. 37: 519—527.

Kaiser W. M., Kandlbinder A., Stoimenova M., Glaab J. 2000. Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: what limits nitrate reduction *in situ*? Planta. 210: 801—807.

Logan D. C. 2006. Plant mitochondrial dynamics. Biochem. biophys. acta. 1763: 430—441.

Meyer C., Lea U. S., Provan F., Kaiser W. M., Lillo C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? Photosynthesis Res. 83: 181—189.

Nigel M., Crawford N. M., Forde B. G. 2002. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. The Arabidopsis Book. 25 p.

Planchet E., Gupta K. J., Sonoda M., Kaiser W. M. 2005. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. Plant J. 41: 732—743.

Repka J., Marek J., Hraska S., Bezo M. 1981. Starch release from chloroplasts of wheat flag leaf. Photosynthetica. 15: 256—257.

Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Cell Biol. 17: 208—212.

Tander B. 1990. Improved uranyl acetate staining for electron microscopy. J. Electron. Microsc. Techn. 16: 81—82.

Voitsekhovskaja O. V. 2002. On the role of sugar compartmentation and stachyose synthesis in symplastic phloem loading. Göttingen: Cuvillier. 170 p.

Walch-Liu P., Filleur S., Gan Y., Forde B. G. 2005. Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. Photosynthesis Res. 83: 239—250.

Поступила 6 VIII 2007

DYNAMICS OF ULTRASTRUCTURE CHANGES IN SHEET PLATE FIBER FLAX WITH BRAKING TRANSPORT ASSIMILATE BY NITRATE-ANION

F. A. Abdrakhimov, S. N. Batasheva, G. G. Bakirova, V. I. Chikov¹

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KNC RAS;

¹ mail: chikov@kzn.ru

Changes in leaf mesophyll cell ultrastructure under nitrate feeding into the apoplast of common flax (*Linum usitatissimum* L.) in the form of 50 mM KNO₃ solution were studied. In 30 min after the beginning of nitrate feeding through the transpiration water stream, swelling of mitochondrial and microbodies, clarification of their matrices, and curling of dictyosome discs into annular structures were observed. These events characterized symplastic domain formed by mesophyll, bundle sheath and phloem parenchyma cells, and were not found in companion cell-sieve element complex. Simultaneously, formation of large central vacuoles in companion cells was noted. Restoration of organelle structures in assimilating cells and phloem parenchyma in 1—2 h after treatment was accompanied by enhancement of morphological changes in phloem elements and companion cells and signs of plasmolysis in the mesophyll cells. It was supposed that the two-phase character of changes in leaf organelle ultrastructure and photosynthesis might reflect duality of leaf cell response to nitrate ion. The rapid alterations of the structure can be coupled with direct influence of the anion on cell metabolism and(or) with signal-regulatory functions of oxidized nitrogen forms, while the slower ones reflect the result of suppression of photoassimilate export from leaves by the anion.

Key words: ultrastructure, photosynthesis, transport of assimilates, minor vein, nitrates.