

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНЫХ ДОЖДЕЙ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИСТЬЕВ ГОРОХА

© О. В. Полищук,¹ М. В. Водка, Н. А. Белявская, А. П. Хомочкин, Е. К. Золотарева

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев, 01601;

¹ электронный адрес: polishch@yandex.ru

В условиях лабораторной имитации кислотного дождя (ИКД) исследовали ультраструктуру и функциональные показатели фотосинтетического аппарата (ФСА) листьев гороха. Листья 14-суточных растений опрыскивали водным раствором NaNO_3 (0.2 мМ) и Na_2SO_4 (0.2 мМ) (рН 5.6, контрольный вариант) либо тем же раствором, подкисленным до рН 2.5 с помощью слабого эквимольного раствора HCl и H_2SO_4 (кислотный вариант). Функциональные характеристики ФСА оценивали методом индукции флуоресценции хлорофилла. Показано уменьшение эффективности фотосинтетического электронного транспорта на 25 %, сопровождавшееся ростом квантового выхода тепловой диссипации избыточных квантов света на 85 % без значительного изменения максимального квантового выхода фотохимических реакций ФС2 (F_v/F_m). Ультраструктурные изменения в хлоропластах после 2-суточной обработки листьев ИКД регистрировали методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). При этом наблюдали изменения в строении гран, неоднородность упаковки тилакоидов в гранах, увеличение поперечных размеров тилакоидов и расширение внутритилакоидного пространства по сравнению с контролем. В хлоропластах, изолированных из листьев, обработанных ИКД, значительно снижалась карбоангидразная активность. Выдвинуто предположение об участии хлоропластной карбоангидразы в поддержании гранальной структуры тилакоидов. Возможным следствием ее инактивации под воздействием ИКД, приводящей к нарушению бикарбонат-углекислотного равновесия, являются структурные нарушения и ингибирование фотохимической активности хлоропластов. Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии кислотных дождей на фотосинтетический аппарат и структуру мембранной системы хлоропластов.

Ключевые слова: бикарбонат, граны, кислотные дожди, тилакоиды, фотосинтетический аппарат, хлоропласты, *Pisum sativum* L.

Принятые сокращения: ИКД — имитированный кислотный дождь, КА — карбоангидраза, ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия, ФС1 — фотосистема 1, ФС2 — фотосистема 2, ФСА — фотосинтетический аппарат.

Кислотные дожди являются наиболее распространенным следствием антропогенного загрязнения окружающей среды, затрагивающим значительную часть территорий индустриально развитых государств. Кислотные осадки в виде дождя, снега, тумана или росы пагубно влияют на состояние природных экосистем, оказывают негативный эффект на растительность либо непосредственно, повреждая главным образом листья, либо косвенно — через почву и корневую систему, способствуя более высокой растворимости таких токсичных металлов, как кадмий, ртуть и свинец, и их освобождению из донных отложений и почв. В условиях закисления почвы атмосферные загрязнения приводят к деградации лесов и изменению видового разнообразия природных экосистем (Likens, Borgmann, 1974).

Значение рН 5.6 является нормальным показателем кислотности дождевой воды, а кислотными принято считать все виды метеорологических осадков (дождь, снег, град, дождь со снегом и туман) с рН 5 (Исидоров, 2001). Кислотные дожди образуются при взаимодействии во-

дных паров атмосферы с такими веществами, как оксид серы (SO_2) и оксиды азота (NO_x), выделяющимися при сжигании угля и древесины и присутствующими в значительных количествах в выхлопных газах автомобилей, выбросах металлургических предприятий и тепловых электростанций. Вступая в реакцию с водой атмосферы, эти оксиды превращаются в растворы кислот — серной, сернистой, азотистой и азотной — и в составе дождя или снега выпадают на землю. Следует отметить, что выпадение серы с осадками в 4 раза превосходит выпадение азота (Базилевич и др., 1986).

Кислотные осадки могут иметь природное происхождение, связанное с выбросом в атмосферу вулканических кислотопродуцирующих газов, а также с образованием окислов азота в воздухе при разрядах атмосферного электричества.

Воздействие кислотных дождей на растения приводит к характерным симптомам повреждения листьев, биохимическим, анатомическим и ультраструктурным изменениям фотосинтетического аппарата (Stoyanova, Veliko-

va, 1997; Tarhanen, 1998; Gabara et al., 2003; Wen et al., 2011; Sun et al., 2012). Основные ультраструктурные изменения под влиянием кислотных дождей наблюдаются в мезофилле листьев, хлоропластах и митохондриях (Gabara et al., 2003).

Под действием ИКД изменяется способность растений фиксировать CO_2 при фотосинтезе и ингибируется синтез глюкозы и других сахаров (Velikova et al., 1999), снижается содержание хлорофиллов *a* и *b* (Neufeld et al., 1985; Shaukat, Khan, 2008).

Согласно результатам Ньюфелда с соавторами (Neufeld et al., 1985), подавление фотохимической активности и эффективности фотосинтетического карбоксилирования после обработки листьев ИКД является результатом снижения проводимости мезофилла для CO_2 . Позднее в другой работе был подтвержден вывод об отрицательном влиянии ИКД на эффективность газообмена (Velikova et al., 1999). Авторы показали, что ингибирование фотосинтеза в листьях под воздействием ИКД связано с понижением внутриклеточной проводимости CO_2 . Обработка ИКД также приводила к увеличению компенсационной точки по CO_2 и нефотохимического тушения, изменению кривых зависимости фотосинтеза от уровня интенсивности света и концентрации CO_2 .

Известно, что внутриклеточный транспорт CO_2 в листьях растений от устьиц к хлоропластам и к центрам карбоксилирования облегчается за счет каталитической активности карбоангидразы (КА, карбонатгидролаза КФ 4.2.1.1), ускоряющей обратимую гидратацию CO_2 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$).

В растительных клетках КА представлена множественными формами, локализованными в цитоплазме и строме хлоропластов. Работы последних лет показали наличие нескольких центров активности КА в тилакоидах (Иванов и др., 2007). В частности, установлено присутствие КА в комплексе ФС2 (Shutova et al., 2008). Высказано предположение (Золотарева, 2009), что тилакоидная КА контролирует пул мембрано-связанного бикарбоната, принимающего участие в регуляции фотохимической активности хлоропластов (Baranov et al., 2000; Stemler, 2002).

Ранее при изучении влияния тяжелых металлов на ультраструктуру хлоропластов нам удалось показать, что КА тилакоидов принимает участие в поддержании уровня мембрано-связанного бикарбоната и контролирует ультраструктурную организацию тилакоидной мембранной системы хлоропласта (Водка и др., 2013).

Снижение внутриклеточного pH под воздействием ИКД изменяет условия углекислотного равновесия, что может повлиять на активность КА и в свою очередь будет сказываться на внутриклеточной проводимости CO_2 и в конечном итоге на скорости фотосинтеза.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния ИКД на функциональные и ультраструктурные характеристики фотосинтетического аппарата листьев гороха, а также проверка предположения о роли тилакоидной карбоангидразы в негативном влиянии ИКД на фотохимическую активность хлоропластов.

Материал и методика

В опытах использовали листья 14-суточных проростков *Pisum sativum* L. (сорт Уладовский 10), которые росли на минеральной среде (pH 6.5). Проростки однократно в течение 3 мин опрыскивали из пульверизато-

ра 1 л эквимольного 0.2 мМ раствора NaNO_3 и Na_2SO_4 с pH 5.6 (контрольный вариант) или 2.5 (ИКД). Затем растения выдерживали еще 2 сут при 22 °C и освещенности 150 мкмоль квантов/($\text{m}^2 \cdot \text{c}$), после чего образцы листьев гороха фиксировали для последующего исследования ультраструктурных изменений в хлоропластах методом ТЭМ.

Для ультраструктурного анализа из средней части листьев вырезали фрагменты длиной 2 мм. Предварительную фиксацию материала проводили при комнатной температуре путем вакуумной инфильтрации 2.5%-ным глутаровым альдегидом в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2), после чего образцы оставляли в свежем растворе того же фиксатора на 4 ч при 4 °C. Затем образцы промывали в том же буфере (2 раза по 20 мин) и проводили постфиксацию материала 1%-ным раствором OsO_4 в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) в течение ночи при 4 °C. Образцы обезвоживали, обрабатывая пробы серией растворов этилового спирта возрастающей концентрации и пропиленоксидом. Полученный материал пропитывали в смесях эпоксидных смол и пропиленоксида, заливали в эпон-аралдитную смолу и переносили в термостат для полимеризации при 37 и 60 °C.

Ультратонкие срезы клеток (70—80 нм) получали с помощью ультрамикротомы LKB-V (LKB, Швеция), снимали на однощелевые бленды, покрытые формваровой пленкой, затем контрастировали 1%-ным водным раствором уранил-ацетата в течение 30 мин в темноте и раствором цитрата свинца в течение 3—5 мин.

Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1300 (JEOL, Япония). Изображения срезов фотографировали на пленку для электронной микроскопии типа EB19H (AGFA, Бельгия). Негативы фотографий хлоропластов и их фрагментов переводили в цифровой формат на сканере Epson Perfecti-on 3200 Photo scanner и анализировали с помощью компьютерных программ Adobe Photoshop 7.0 и Corel Photo-Paint 11. Морфометрический анализ изображений хлоропластов и определение поперечных размеров тилакоидов гран проводили с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США) (рис. 1). Расстояния между точками M (рис. 1, б) считали шириной тилакоида, а ширину люмена определяли по ширине положительных пиков.

Для каждого варианта анализировали изображения 30 зафиксированных клеток листьев. На каждом изображении с использованием статистических методов обработки данных определяли размеры у 10 гран тилакоидов, снятых при увеличении 10 000 \times , 15 000 \times или 100 000 \times . Достоверность различий средних значений между опытными и контрольными вариантами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Разницу считали достоверной при $p \leq 0.05$.

Определение функциональных параметров фотосинтетического аппарата методом индукции флуоресценции хлорофилла. Флуоресценцию хлорофилла *a* в листьях гороха измеряли с помощью флуориметра ХЕ-РАМ (Walz, Германия). Флуоресценцию хлорофилла возбуждали модулированным синим светом ($\lambda_{\text{макс}} = 450 \text{ нм}$) и регистрировали в красном спектральном диапазоне ($\lambda > 695 \text{ нм}$). F_0 — начальный выход флуоресценции при слабом освещении (0.075 мкмоль квантов/($\text{m}^2 \cdot \text{c}$)); F_m — максимальный выход флуоресценции при насыщающей вспышке белого света длительностью 1 с и интенсивностью 3000 мкмоль квантов/($\text{m}^2 \cdot \text{c}$). Для определения параметров флуорес-

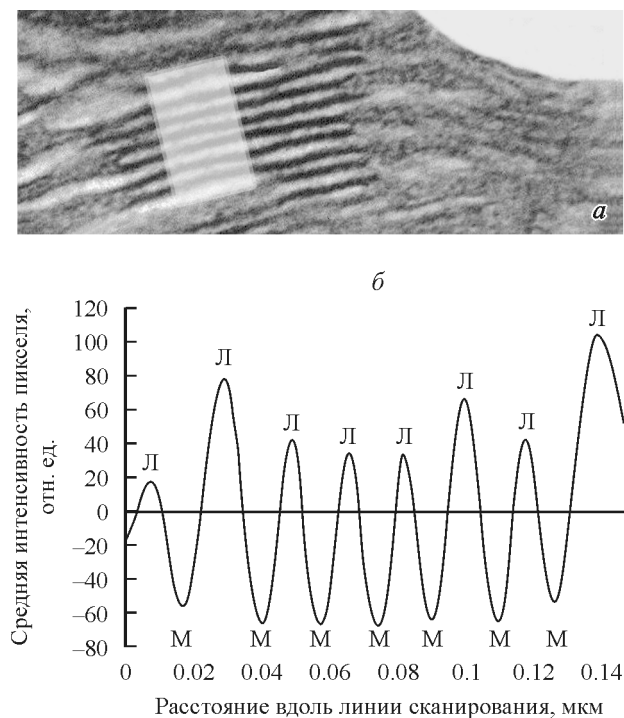


Рис. 1. Пример расчета ширины внутритилакоидного пространства и толщины тилакоидных мембран по средней интенсивности пикселей.

a — фрагмент хлоропласта, в котором светлым прямоугольником указана область сканирования; *b* — профиль линейного сканирования, отображающий интенсивность пикселей относительно средней интенсивности пикселей стромы. Л — люмен тилакоида, внутритилакоидное пространство, характеризуется более светлыми пикселями по сравнению со стромой. Две мембраны смежных тилакоидов на рисунке сливаются в одну темную полосу. Расстояние между точками М — ширина тилакоида, а ширина положительного пика, соответствующего зоне, более светлой, чем строма, — ширина люмена.

ценции из листьев, адаптированных к темноте в течение 3 мин, вырезали диски диаметром 1 см.

Определяли следующие параметры флуоресценции хлорофилла, отражающие важные характеристики ФСА: F_v/F_m — максимальный квантовый выход фотохимических реакций ФС2 (Van Kooten, Snel, 1990), эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС2 (F'_v/F'_m) (Maxwell, Johnson, 2000), фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (qP) (Schreiber et al., 1986), нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (qN) (Van Kooten, Snel, 1990), квантовый выход электронного транспорта (φФС2) (Genty et al., 1989). Также проводили дифференцированное определение квантовых выходов компонентов нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла — ϕ_{qe} , ϕ_{qt} и ϕ_{qi} (Guadagno et al., 2010).

Представлены усредненные данные, полученные в 3—5 экспериментах, в каждом из которых было исследовано по меньшей мере 3 повторности.

Выделение хлоропластов. Хлоропласты класса «С» изолировали из листьев гороха (2 г) по методу Аврона (Avron, 1980) с небольшими модификациями. Среду выделения, содержащую 20 мМ Трис-НС1-буфера (рН 7.8), 5 мМ $MgCl_2$, 300 мМ сахарозы, 10 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА, замораживали до появления кристаллов льда и все операции по выделению хлоропластов проводили при 2—4 °С. Листья разрушали механически с по-

мощью ручного блендера MR530 (Braun, Германия) двумя циклами по 20 с при максимальной скорости. Гомогенат отжимали через два слоя нейлоновой ткани, фильтрат центрифугировали при 800 g в течение 1 мин. Затем осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали в течение 5 мин при 3000 g. Осадок промывали средней выделением и после переосаждения суспендировали в минимальном объеме среды выделения. Суммарное содержание хлорофиллов в суспензии определяли в ацетоновом экстракте по методу Арнона (Arnon, 1949).

Карбоангидразную активность изолированных хлоропластов гороха определяли по скорости выделения CO_2 в реакции дегидратации бикарбоната натрия по методике, описанной ранее (Семенихин и др., 2014). Скорость реакции регистрировали непосредственно по ускорению потока CO_2 с помощью инфракрасного газоанализатора Q-S151 (Qubit Systems, Канада).

Результаты и обсуждение

Анализ функциональных параметров фотосинтетического аппарата. Активность фотохимических процессов в листьях гороха, обработанных ИКД, оценивали методом индукции флуоресценции хлорофилла. Типичные кривые изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* контрольных и обработанных ИКД листьев гороха показаны на рис. 2. Существенное различие состояло в пониженном уровне F'_m в обработанных ИКД листьях по сравнению с контролем и ускоренном росте значения F'_m со временем после выключения действующего света. В остальном различия между контрольным и обработанным ИКД вариантами были минимальны, а измерения характеризовались высокой воспроизводимостью. В соответствии с методикой, представленной на рис. 1, рассчитывали в первую очередь соотношение F_v/F_m — максимальный потенциальный квантовый выход ФС2, параметр, который считается показателем функционального состояния фотосинтетического аппарата растений (Van Kooten, Snel, 1990). Также определяли квантовые выходы различных процессов распределения световой энергии — ϕ_{PSII} , ϕ_{qe} , ϕ_{qt} и ϕ_{qi} . Параметр ϕ_{PSII} характеризует эффективность использования квантов света в электрон-транспортной цепи хлоропласта при освещении действующим светом. Параметр ϕ_{qe} характеризует эффективность тепловой диссипации энергии квантов света в ФС2 с участием рН-чувствительных зеаксантинзависимых механизмов, ϕ_{qt} — часть квантов, которые перенаправляются в ФС1 вследствие миграции светособирающей антенны от ФС2, и наконец, параметр ϕ_{qi} отражает вклад тушения энергии в реакционном центре в ходе инактивации ФС2. Результаты исследований представлены на рис. 2.

Из приведенных данных следует, что максимальный потенциальный квантовый выход у листьев контрольных растений был достаточно высоким и составлял 0.78 (рис. 3), что свидетельствует об отсутствии стрессовых условий при выращивании материала. У растений, обработанных ИКД в условиях эксперимента, этот параметр практически не изменялся. Следовательно, через 2 сут после обработки растений ИКД значительных повреждений фотосинтетического аппарата не наблюдалось. Это подтверждается также низким уровнем параметра ϕ_{qi} (0.07) и отсутствием в нем изменений даже при ярком освещении, интенсивность которого втрое превосходила

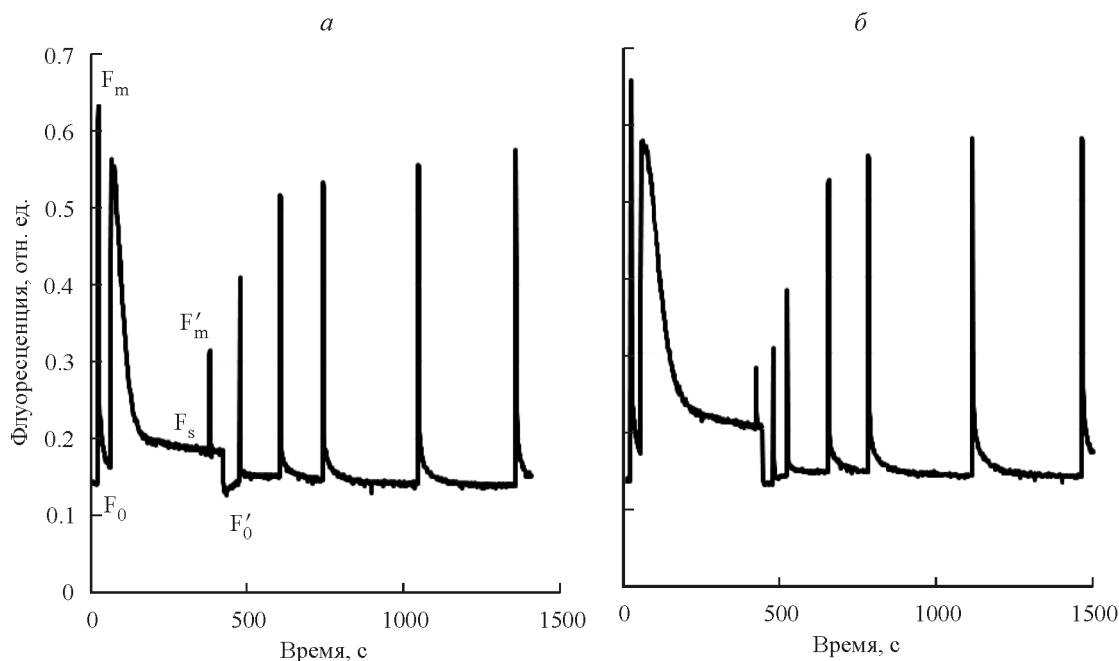


Рис. 2. Типичные кривые флуоресценции хлорофилла, зарегистрированные на высечках из листьев гороха после имитации кислотного дождя (а), по сравнению с контролем (б).

уровень освещенности при выращивании, не отмечено значительной инактивации ФС2 в результате фотоингибирования.

Хотя снижение величины F_v/F_m является одним из основных индикаторов стрессового состояния, целый ряд факторов, негативно влияющих на растения, не приводит к изменению этого параметра (Baker, Rosenquist, 2004). Это происходит в тех случаях, когда стрессовое воздействие не нарушает первичных фотохимических реакций в ФС2. Например, значение F_v/F_m практически не изменялось при обработке листьев фасоли ИКД, если pH раствора составлял не менее 2.2—2.4 (Velikova, Yordanov, 1996). Незначительное снижение параметра F_v/F_m (с 0.84

до 0.82) при обработке растений ИКД с pH 3.5 регистрировалось в работе Вена с соавторами (Wen et al., 2011). В то же время о снижении параметра F_v/F_m с 0.81 до 0.73 у листьев сои в результате действия ИКД с pH 3.0 сообщалось в работе Сана с соавторами (Sun et al., 2012). В работе, выполненной на листьях фасоли (Velikova et al., 1999), отмечали значительное падение величины F_v/F_m (с 0.802 до 0.594) при обработке растений раствором с pH 1.8. Однако снижение максимального потенциального квантового выхода происходило лишь в первые часы после действия ИКД, и уже через 1 сут этот параметр начинал возвращаться к исходному уровню (Velikova et al., 1999).

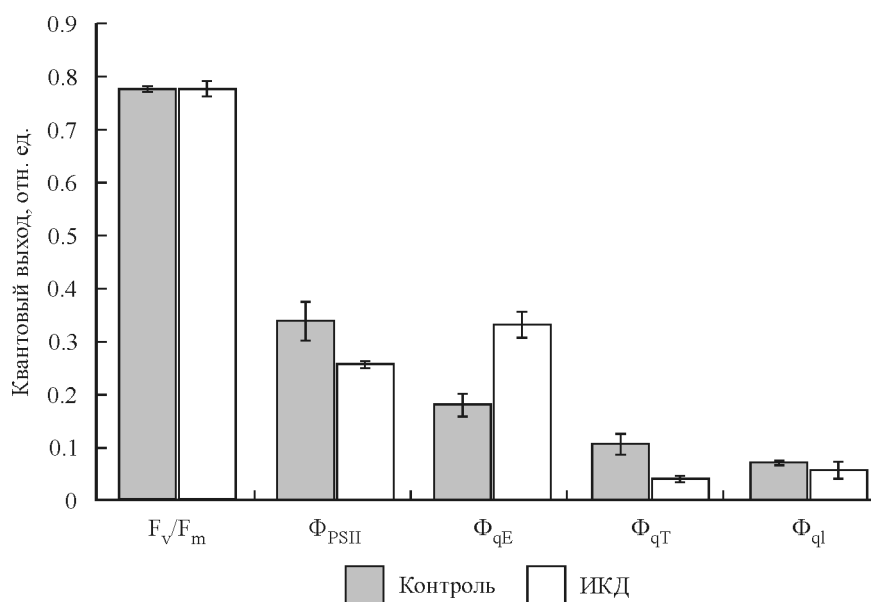


Рис. 3. Квантовые выходы различных процессов трансформации энергии света в фотосинтетическом аппарате листьев *Pisum sativum* L. в условиях имитации кислотного дождя.

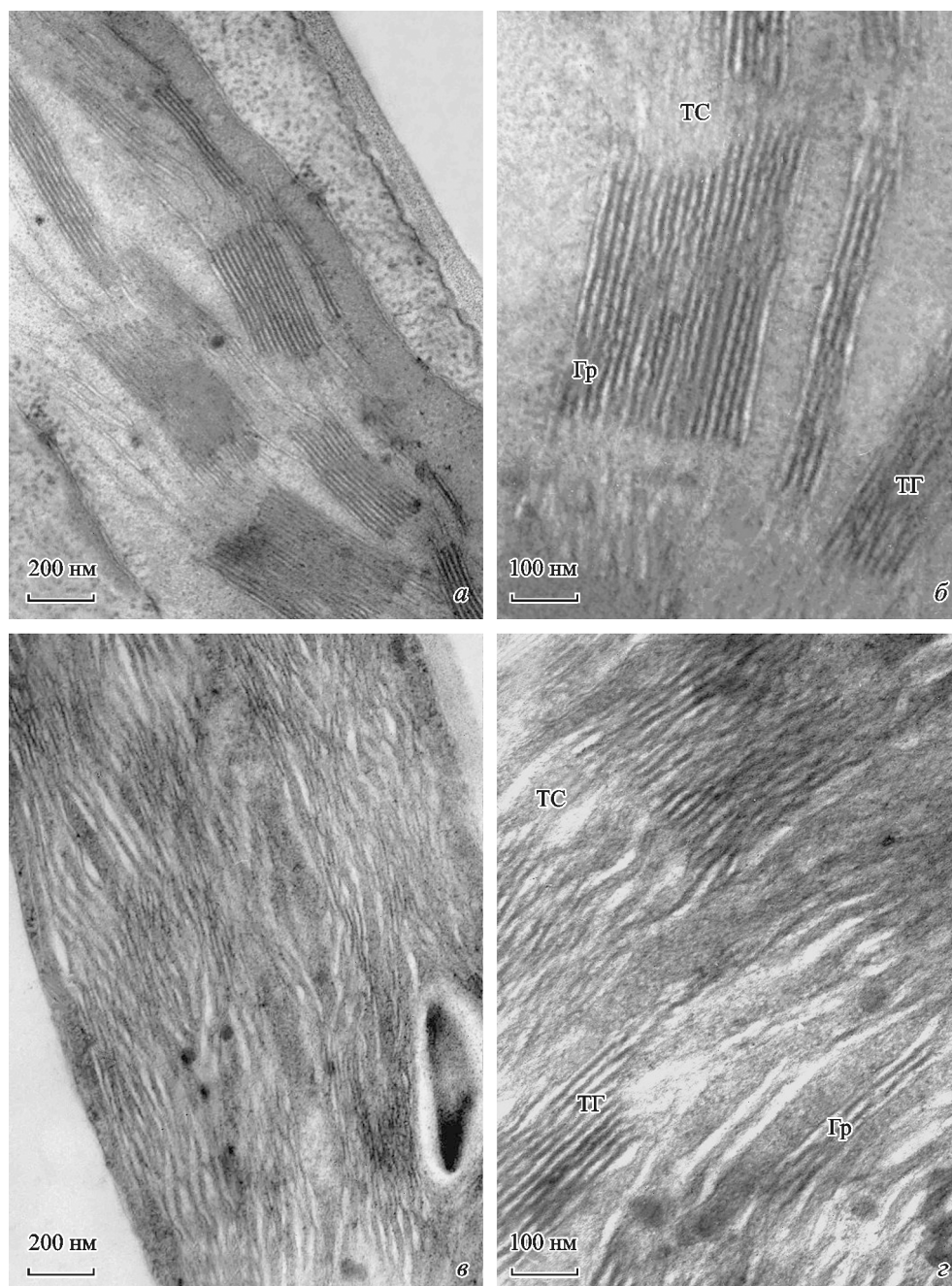


Рис. 4. Ультраструктура гран хлоропластов листьев гороха; регулярная структура гран в контроле (а, б), набухшие и извилистые тилакоиды гран после обработки кислотным дождем (в, г).

Гр — грана, ТГ — тилакоиды гран, ТС — тилакоиды стромы.

Согласно нашим результатам, приведенным на рис. 3, квантовый выход электронного транспорта в ФС2 (ϕ_{PSII}) листьев, обработанных ИКД, уменьшался на 25 %, что сопровождалось ростом ϕ_{qE} — квантового выхода тепловой диссипации энергии избыточных квантов света — на 85 %. В сосудистых растениях основным компонентом тушения энергии в антенне, который длится от секунд до десятков секунд, является qE , который инициируется низким внутритилакоидным рН (Avenson et al., 2005) и связан с виолаксантиновым циклом.

Согласно современным представлениям, этот процесс включает в себя рН-зависимую активацию локализованной в люмене тилакоида виолаксантин-деэпоксидазы

и превращение виолаксантина в антераксантин и зеаксантин; протонирование экспонированных в люмен аминокислотных остатков гомодимера полипептида PsbS, ассоциированного с кором ФС2; мономеризацию PsbS и его ассоциацию со светособирающим комплексом ФС2; присоединение зеаксантина к протонированному PsbS, что обеспечивает перенос энергии возбужденных молекул хлорофилла на зеаксантин, который быстро релаксирует до основного состояния путем тепловой диссипации энергии. Таким образом, снижение рН в люмене тилакоидов является сигналом, запускающим зеаксантинзависимую тепловую диссипацию энергии фотонов, проявляющуюся в виде тушения флуоресценции хлорофилла *a* —

qE (Pérez-Bueno et al., 2008). Активацию этого процесса при одновременном подавлении электронного транспорта можно объяснить как снижением pH стромы, так и дестабилизацией бикарбонатной буферной системы тилакоидов, которая модулирует уровень pH в люмене и предотвращает его резкие колебания (Золотарёва, 2009). Эффективность функционирования регуляторного механизма qT зависит от пространственной конфигурации тилакоидов, поскольку в него вовлечены мембранно-связанные ферменты, а суть заключается в миграции пигмент-белкового суперкомплекса в тилакоидной мембране.

Снижение показателя ϕ_{qT} от 0.10 в контроле до 0.03 в случае ИКД может быть связано с нарушениями ультраструктуры хлоропластов и изменением физико-химических свойств липидного бислоя тилакоидных мембран.

Влияние ИКД на ультраструктуру гран хлоропластов. На рис. 4 представлены электронные микрофотографии срезов фрагментов хлоропластов из мезофилла листьев гороха. В образцах контрольного варианта (рис. 4, а) четко выделяются отдельные грани, тилакоиды стромы. При большем увеличении видна интактная грана, состоящая из 19 тилакоидов, от конечных участков которых отходят тилакоиды стромы; тилакоиды в гране плотно упакованы и равномерно распределены в стопках (рис. 4, б).

При сравнении с контрольным образцом хлоропластов из листьев, которые обрабатывались ИКД, можно отметить разрыхление общей структуры гран и набухание тилакоидов. Кроме того, наблюдается также волнистость упаковки тилакоидов (рис. 4, в, г). Данные морфометрического анализа и результаты определения размеров тилакоидов приведены в таблице, из которой следует, что толщина тилакоидов гран увеличивается на 28 %, а размер внутритилакоидного (люменального) пространства — на 21 % по сравнению с контролем.

Похожие изменения в строении тилакоидной системы хлоропластов после ИКД были зарегистрированы у *Phaseolus vulgaris* (Stoyanova, Velikova, 1997), в то время как волнистость тилакоидов и увеличение толщины гран были описаны у *Bryoria fuscescens* (Tarhanen, 1998). Разрыхление гран, сокращение числа тилакоидов в гране и увеличение внутритилакоидных промежутков также были отчетливо видны на электронных микрофотографиях образцов, полученных из листьев сои *Glycine max* после ИКД с pH 4.5 и 3.5 (Wen et al., 2011), а также 4.5 и 3.0 (Sun et al., 2012). Причем наблюдаемая реакция значительно возрастала при снижении pH. Необходимо отметить, что ИКД, примененный в настоящем исследовании, имел более низкий уровень pH (2.5), чем в этих работах. В то же время в цитируемых работах растения выращивали на водных питательных растворах, pH которых понижали до уровня действующего ИКД — с 7.0 (контроль) до 4.5, 3.5 и 3.0 соответственно. Таким образом, в этих экспериментах отрицательное действие ИКД воспроизводилось более полно. Возможно, из-за этого ультраструктурные изменения в тилакоидной системе *G. max* были более выраженными, чем у хлоропластов гороха, описанных в нашей работе, при аналогичном характере изменений.

Такие ультраструктурные изменения хлоропластов не являются специфическими для кислотных дождей, они также наблюдаются при различных стрессовых ситуациях, например при воздействии токсичных металлов (Barcelo et al., 1988; Krzechowska, Wozny, 1996), повышенной кислотности почвы (Wulff et al., 1994), ионном

Влияние ИКД на размеры тилакоидов в гранах хлоропластов листьев гороха

Вариант опыта	Толщина тилакоидов гран, мкм	Ширина люминального пространства, мкм
Контроль	0.01086 ± 0.00940	0.00628 ± 0.00540
ИКД	0.01392 ± 0.00123 ^a	0.00759 ± 0.00620 ^a

^a Отличие от контроля, $p < 0.05$.

(Hecht-Buchholz, 1983; Ouzounidou et al., 1995; Alscher et al., 1997) и кислородном (Vartapetian, Zakhmilova, 1990) дефиците.

Ранее разрыхление гранальной системы хлоропластов и увеличение внутритилакоидных промежутков мы наблюдали при обработке хлоропластов ионами тяжелых металлов (Водка и др., 2013) и обнаружили, что одновременно в тех же препаратах подавлялась активность КА, обеспечивающей быстрый взаимный переход форм угольной кислоты и участвующей во внутриклеточном транспорте углекислого газа к центрам карбоксилирования. В последнее время широко обсуждается роль тилакоидных КАз в обеспечении эффективного фотосинтеза (Иванов, 2007; Shutova et al., 2008; Золотарева, 2009), однако до настоящего времени их функции остаются предметом дискуссий. Предположение о возможном участии тилакоидных КАз в контроле строения мембранной системы хлоропластов было сформулировано нами в недавней работе (Водка и др., 2013). В настоящем исследовании мы проверяли это предположение с использованием хлоропластов из листьев растений гороха после ИКД с pH 2.5.

Влияние ИКД на активность КА. На рис. 5 показаны в сравнении уровни активности КА контрольных хлоропластов и изолированных из обработанных ИКД листьев. Видно, что в результате воздействия ИКД активность КА снижалась в 3 раза.

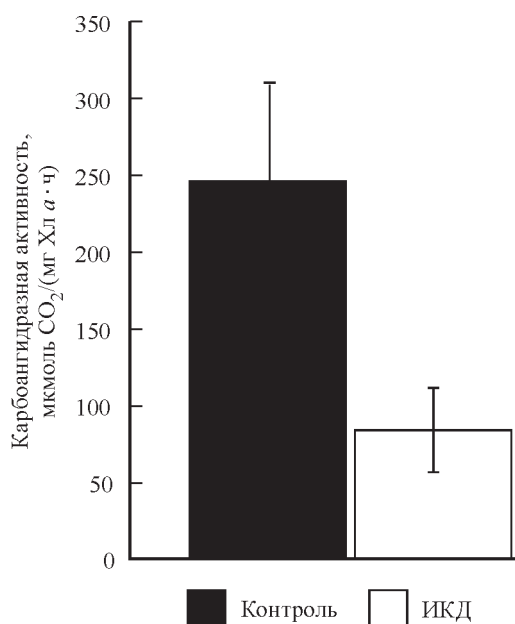


Рис. 5. Влияние имитированного кислотного дождя на карбоангидратную активность хлоропластов класса «С», изолированных из листьев гороха.

Столь значительное снижение активности КА в хлоропластах листьев, обработанных ИКД, позволяет предполагать, что одной из причин негативного влияния ИКД на фотосинтез является нарушение внутрилклеточного бикарбонатного обмена, катализируемого КА. Ультраструктурные изменения системы тилакоидных мембран хлоропластов в этом случае, а именно расширение внутритилакоидного пространства и увеличение толщины гранальных тилакоидов, могут быть связаны с замедлением превращения бикарбоната в форму угольной кислоты и CO_2 и накоплением гидратированных ионов HCO_3^- в водном внутритилакоидном пространстве. В свою очередь CO_2 из-за более высокой растворимости в гидрофобных средах (Gutknecht et al., 1977) может накапливаться в липидной фазе тилакоидов, поскольку для его эффективного вывода из липидного бислоя необходима гидратация в гидрофильном примембранном слое, катализируемая КА. Таким образом, ингибирование КА создает барьеры для свободного обмена и трансмембранного переноса форм угольной кислоты и может быть причиной структурных нарушений в тилакоидной системе.

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что кислотные дожди негативно влияют на структуру мембранной системы хлоропластов, а также на эффективность фотосинтетического электронного транспорта, увеличивают тепловую диссипацию энергии без изменения максимального квантового выхода фотохимических реакций ФС2. В условиях повышенной кислотности происходят ингибирование КА, замедление интерконверсии бикарбоната и CO_2 , что может приводить к накоплению гидратированных ионов HCO_3^- в водном внутритилакоидном пространстве, вызывая расширение внутритилакоидного пространства и увеличение толщины гранальных тилакоидов.

Список литературы

- Базилевич Н. И., Гребенщиков О. С., Тишков А. А. 1986. Географические закономерности структуры и функционирования экосистем. М.: Наука. 296 с. (Bazilevich N. I., Grebenshchikov O. S., Tishkov A. A. 1986. Geographic patterns in structure and function of ecosystems. M.: Nauka. 296 p.)
- Водка М. В., Полищук А. В., Белявская Н. А., Золотарева Е. К. 2013. Действие тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат и активность карбоангидразы хлоропластов гороха. Вестн. Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. биол. 30(1) : 46—55. (Vodka M. V., Polishchuk A. V., Belyavskaya N. A., Zolotareva E. K. 2013. Effects of heavy metals, carbonic anhydrase inhibitors, on photosynthetic apparatus of pea leaf chloroplasts. Bull. Kharkiv Nat. Agrar. Univ. Ser. Biol. 30 (1) : 46—55.)
- Золотарева Е. К. 2009. Участие связанного бикарбоната в фотосинтетическом протонном транспорте. В кн.: Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. Київ: Логос. 1 : 91—112. (Zolotareva E. K. 2009. Bound bicarbonate participation in photosynthetic transport. In: Plant physiology: problems and perspectives of development. Kyiv: Logos. 1 : 91—112.)
- Иванов Б. Н., Игнатова Л. К., Романова А. К. 2007. Разнообразие форм и функций карбоангидразы высших наземных растений. Физиол. раст. 54 (2) : 165—185. (Ivanov B. N., Ignatova L. K., Romanova A. K. 2007. Diversity in forms and functions of carbonic anhydrase in terrestrial higher plants. Rus. J. Plant Physiol. 54 (2) : 143—162.)
- Исидоров В. А. 2001. Экологическая химия. СПб.: Химиздат. 304 с. (Isidorov V. A. 2001. Ecological chemistry. SPb.: Khimizdat. 304 p.)
- Семенухин А. В., Полищук А. В., Подорванов В. В. 2014. Влияние ионов тяжелых металлов на активность карбоангидразы хлоропластов гороха. Вестн. Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. биол. 32 (1) : 23—31. (Semenikhin A. V., Polishchuk A. V., Podorvanov V. V. 2014. Effect of heavy metals on carbonic anhydrase activity in pea chloroplasts. Bull. Kharkiv Nat. Agrar. Univ. Ser. Biol. 32 (1) : 23—31.)
- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. Physiol. Plant. 100 : 224—233.
- Arnon D. I. 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenolase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24 : 149—154.
- Avenson T. J., Kanazawa A., Cruz J., Takizava A. K., Ettlinger W. E., Kramer D. M. 2005. Integrating the proton circuit into photosynthesis: progress and challenges. Plant Cell Environ. 28 : 97—109.
- Avron M. 1980. Photophosphorylation by swiss-chard chloroplasts. Biochim. biophys. acta. 40 : 257—272.
- Baker N. R., Rosenquist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. J. Exp. Bot. 55 : 1607—1621.
- Baranov S. V., Ananyev G. M., Klimov V. V., Dismukes G. C. 2000. 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. 39 : 6060—6065.
- Barcelo J., Vazquez M. D., Poschenrieder C. H. 1988. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). New Phytol. 108 : 37—49.
- Gabara B., Sklodowska M., Wyrwicka A., Glin'ska S., Gapin'ska M. 2003. Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain. Plant Sci. 164 : 507—516.
- Genty B., Briantais J. M., Baker N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. biophys. acta. 990 : 87—92.
- Guadagno C. R., Virzo De Santo A., D'Ambrosio N. 2010. A revised energy partitioning approach to assess the yields of non-photochemical quenching components. Biochim. biophys. acta. 1797 : 525—530.
- Gutknecht J., Bisson M. A., Tosteson F. C. 1977. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. J. Gen. Physiol. 69 : 779—794.
- Hecht-Buchholz C. H. 1983. Light and electron microscopic investigations of the reactions of various genotypes to nutritional disorders. Plant Soil. 72 : 151—165.
- Krzeczowska M., Wozny A. 1996. Lead uptake, localisation and changes in cell ultrastructure of *Funaria hygrometrica* protonema. Biol. Plant. 38 : 253—259.
- Likens G. E., Bormann F. H. 1974. Acid rain: a serious regional environmental problem. Science. 184 : 1176—1179.
- Maxwell K., Johnson G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. J. Exp. Bot. 51 : 659—668.
- Neufeld H. S., Jernstend J. A., Haines B. L. 1985. Direct foliar effects of simulated acid rain. 1. Damage, growth and gas exchange. New Phytol. 99 : 389—405.
- Ouzounidou G., Ciamparova M., Moustakas M., Karataglis S. 1995. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress. I. Growth mineral content and ultrastructure of roots. Environ. Exp. Bot. 35 : 167—176.
- Pérez-Bueno M., Johnson M. P., Zia A., Ruban A. V., Horton P. 2008. The Lhcb protein and xanthophyll composition of the light harvesting antenna controls the ΔpH -dependency of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 582 : 1477—1482.
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10 : 51—62.
- Shaukat S. S., Khan M. 2008. Growth and physiological responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to simulated acid rain. Pak. J. Bot. 40 : 2427—2435.

- 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. 2008. The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal. *EMBO J.* 27 : 782—791.
- Stemler A. J. 2002. The bicarbonate effect, oxygen evolution, and the shadow of Otto Warburg. *Photosynth. Res.* 73 : 177—183.
- Stoyanova D., Velikova V. 1997. Effects of simulated acid rain on chloroplast ultrastructure of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Biol. Plant.* 40 : 589—595.
- Sun Z., Wang L., Chen M., Wang L., Liang C., Zhou Q., Huang X. 2012. Interactive effects of cadmium and acid rain on photosynthetic light reaction in soybean seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79 : 62—68.
- Tarhanen S. 1998. Ultrastructural responses of the lichen *Bryoria fuscescens* to simulated acid rain and heavy metal deposition. *Ann. Bot.* 82 : 735—746.
- Van Kooten O., Snel J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25 : 147—150.
- Vartapetian B. B., Zakhmilova N. A. 1990. Ultrastructure of wheat seedling mitochondria under anoxia and postanoxia. *Protoplasma.* 156 : 39—44.
- Velikova V., Tsonev T., Yordanov I. 1999. Light and CO₂ responses of photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in bean plants after simulated acid rain. *Physiol. Plant.* 107 : 77—83.
- Velikova V., Yordanov I. 1996. Changes in prompt chlorophyll fluorescence and oxygen evolution after bean plant treatment with artificial acid rain. *Bulg. J. Plant Physiol.* 22 : 14—24.
- Wen K., Liang C., Wang L., Hu G., Zhou Q. 2011. Combined effects of lanthanum ion and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in soybean seedlings. *Chemosphere.* 84 : 601—608.
- Wulff A., Sheppaer L., Leith I. 1994. Evaluation of electrolyte leakage, chlorophyll fluorescence and ultrastructural techniques for detecting effects of acid mist on frost hardiness of Sitka spruce shoots. *Environ. Exp. Bot.* 34 : 261—273.

Поступила 26 VI 2015

THE EFFECT OF ACID RAIN ON ULTRASTRUCTURE AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF PEA LEAVES

A. V. Polishchuk,¹ M. V. Vodka, N. A. Belyavskaya, A. P. Khomochkin, E. K. Zolotareva

M. G. Kholodny Institute of Botany, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Kiev, Ukraine;
¹ e-mail: polishch@yandex.ru

The effects of simulated acid rain (SAR) on the ultrastructure and functional parameters of the photosynthetic apparatus were studied using 14-day-old pea leaves as test system. Pea plants were sprayed with an aqueous solution containing NaNO₃ (0.2 mM) and Na₂SO₄ (0.2 mM) (pH 5.6, a control variant), or with the same solution, which was acidified to pH 2.5 (acid variant). Functional characteristics were determined by chlorophyll fluorescence analysis. Acid rain application caused reduction in the efficiency of the photosynthetic electron transport by 25 %, which was accompanied by an increase by 85 % in the quantum yield of thermal dissipation of excess light quanta. Ultrastructural changes in chloroplast were registered by transmission electron microscopy (TEM) after two days of the SAR-treatment of pea leaves. In this case, the changes in the structure of grana, heterogeneity of thylakoids packaging in granum, namely, the increase of intra-thylakoid gaps and thickness of granal thylakoids compared to the control were found. The migration of protein complexes in thylakoid membranes of chloroplasts isolated from leaves treated with SAR was suppressed. It was shown also that carbonic anhydrase activity was inhibited in chloroplast preparations isolated from SAR-treated pea leaves. We proposed a hypothesis on the possible inactivation of thylakoid carbonic anhydrase under SAR and its involvement in the inhibition of photochemical activity of chloroplasts. The data obtained allows to suggest that acid rains negatively affect the photosynthetic apparatus disrupting the membrane system of chloroplast.

Key words: *Pisum sativum* L., acid rains, bicarbonate, chloroplast, grana, photosynthetic apparatus, thylakoids.