

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМЕНІ М. Г. ХОЛОДНОГО**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА “ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ  
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ”**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ФЕДЮК ОЛЬГА МИРОНІВНА**

УДК 581.174:576.311.347:582.573.21:58.036.5

**ДИСЕРТАЦІЯ  
СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ХЛОРОПЛАСТІВ  
І МІТОХОНДРІЙ ЛИСТКІВ *GALANTHUS NIVALIS* L.  
ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

091– Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Федюк О.М.

Науковий керівник: Білявська Нінель Олександрівна, доктор біологічних наук

**Київ – 2019**

## АНОТАЦІЯ

Федюк О.М. Структурно-функціональні особливості хлоропластів і мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. за низьких температур. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – (091-Біологія) – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», м. Київ, 2019.

В дисертаційній роботі представлено результати досліджень ультраструктурних і функціональних змін хлоропластів та мітохондрій, мікроструктури поверхні і продихів листків, *G. nivalis* за умов впливу низьких температур, а також різних концентрацій екзогенної сахарози.

В природних умовах весняного розвитку *G. nivalis* вплив низьких температур зумовлює морфологічні зміни листків (довжиною до  $L_{л}= 1,5$  см), помірний темп їх росту на етапі появи листків з ґрунту за добових температур від  $-6,8$  до  $-6,5$  °С. При підвищенні температури повітря відбувається стрімкий ріст та збільшення площі листків, яке різко уповільнюється під час квітнення рослин.

Встановлено, що епідермальні клітини листків *G. nivalis* на всіх етапах весняного розвитку вкриті товстим шаром кутикули та епікутикулярним воском. Опуклість сусідніх клітин поблизу занурених в епідерму продихів, ймовірно, спрямована на захист продихів від руйнівного механічного впливу, який виникає ранньою весною на початку просування молодих листків крізь шар опалого листя та снігового покриву. Над поверхнею кутикули виявлено кристалоїди воску у вигляді пластинок різноманітної форми, згрупованих у зірчасті фігури, які разом з ділянками поверхні увігнутої форми формують горбистий захисний покрив для листків. Така структура, очевидно, здатна

преломлювати та розсіювати надмірний потік фотонів, який ранньою весною безлисті крони дерев пропускають до поверхні ґрунту, і таким чином захищати листки *G. nivalis*.

Вплив низьких температур повітря та потужного потоку світла також зумовлює у молодих листків *G. nivalis* (до  $L_{\text{л}}=1,5$  см) повне закриття продихів на адаксіальній поверхні та лише часткове їх відкриття у 20% продихів на абаксіальній поверхні, тоді як у період квітнення, навпаки, відсоток відкритих продихів на адаксіальній стороні досягає 59% і на абаксіальній – 30%, що вказує на низький рівень продихової транспірації. Потовщену кутикулу і високий відсоток закритих продихів можна розглядати як адаптацію до умов ранньої весни, спрямовану на збереження води і уникнення емболії в ксилемі.

Дослідження особливостей структурних змін мітохондрій за низьких температур показали, що протягом усього весняного періоду розвитку ефемероїда мітохондрії залишаються інтактними. При появі листків ( $L_{\text{л}}=1,5$  см) над поверхнею ґрунту мітохондрії мали слабо розвинуті кристи і матрикс помірної щільності; в подальшому (при  $L_{\text{л}}=3$  см) розміри крист і довжини мітохондрій збільшувались, що вказує на підготовчий етап до інтенсивного продукування АТФ. Перед бутонізацією за температур від  $-3,6$  до  $+2,2$  °С (при  $L_{\text{л}}=7$  см) максимально збільшувались щільність матриксу і розвиток крист, що корелювало зі збільшенням довжини мітохондрій. На етапі бутонізації (при  $L_{\text{л}}=13$  см) за температури повітря до  $+8,5$  °С довжина мітохондрій зменшувалась. Під час квітнення (при  $L_{\text{л}}=15$  см) довжина мітохондрій продовжувала зменшуватись, вони мали помірну кількість вкорочених крист та електронно-прозорий матрикс, що є ознаками зниження їх функціональної активності.

Результати дослідження зв'язку між температурою, вологістю повітря й диханням листків *G. nivalis* показали, що інтенсивність загального дихання максимально зростає на вегетативному етапі (при  $L_{\text{л}}=7$  см) за найвищого значення відносної вологості (88%) і температури  $+2,2$  °С. При цьому зв'язок загального дихання з температурою навколишнього середовища виявляється

слабким. Порівняно із загальним диханням інтенсивність альтернативного дихання була максимальною на вегетативному етапі і найменшою на етапі бутонізації. Висока інтенсивність альтернативного дихання за низьких температур, очевидно, вказує на необхідність енергетичного забезпечення певного рівня метаболізму та інтенсивності всіх біохімічних реакцій в організмі рослини на фоні низького загального дихання.

Дослідження якісних та кількісних особливостей ультраструктури хлоропластів *G. nivalis*, зумовлених впливом низьких температур атмосферного повітря, показало, що при появі листків ( $L_{\text{л}} = 1,5$  см) над поверхнею ґрунту хлоропласти переважно видовжені і рідко мають вирости (струмули). У безкрохмальних хлоропластах листків присутні невисокі грани, відмічено локальні набрякання тилакоїдів гран і тилакоїдів строми. На вегетативному етапі (при  $L_{\text{л}} = 3-7$  см) наявність численних пластид амебоїдної форми зі струмулами, очевидно, можна пояснити реакцією на низьку температуру.

Площа зрізу хлоропластів досягала максимального значення на пізній стадії вегетативного етапу ( $L_{\text{л}} = 7$  см), до початку квітнення ефемероїду. Зокрема, зі зміною температури атмосферного повітря від  $-6,8$  °C до  $+1,4$  °C від початку росту до пізньої стадії вегетативного етапу площа гран збільшувалась у понад два рази, досягаючи максимуму. Протягом квітнення й плодоношення площа гран у листках поступово зменшувалась.

Застосування методу флуоресценції хлорофілу у адаптованих до темряви листків при активації фотосинтезу різною щільністю потоку фотонів (ЩПФ) (40, 80, 150, 350, 700 або 1000  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) показало, що протягом весняного періоду під час появи листків ( $L_{\text{л}} = 1,5$  см) та на вегетативному етапі розвитку ( $L_{\text{л}} = 3-7$  см) *G. nivalis*, навіть за низьких плюсових температур атмосферного повітря, фотосинтетичний апарат вже є сформованим, залишається непошкодженим і функціонуючим, що підтверджується значеннями показника  $\Phi_{\text{PSII}}$ .

Фотохімічні параметри листків відрізняються на вегетативному й генеративному етапах. Зокрема, при активації світлом з ЩПФ 350  $\mu\text{моль} \cdot$

$\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  у листків на вегетативному етапі коефіцієнт  $qP$  є нижчим порівняно з генеративним етапом. Коефіцієнт нефотохімічного гасіння  $qN$  при тому ж освітленні у листків на генеративному етапі розвитку перевищує його величину на вегетативному етапі, що вказує на активну трансформацію фотосинтетичного апарату в ході онтогенезу.

Швидкість перенесення електронів підвищується зі збільшенням ЩПФ до  $700 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , але при освітлення до  $1000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  швидкість електронного транспорту дещо знижується, що, ймовірно, пов'язано з початком фотоінгібування. Отримані в нашому дослідженні параметри швидкості електронного транспорту вказують на високу фотосинтетичну активність листків *G. nivalis* при невеликих мінусових та плюсових температурах атмосферного повітря на вегетативному етапі, що пов'язано з ультраструктурними змінами хлоропластів.

Експериментально встановлено, що у листків *G. nivalis*, які ростуть в лабораторних умовах, екзогенна сахароза здатна впливати на структуру хлоропластів листків за умов впливу низьких температур. У листків, оброблених різними концентраціями екзогенної сахарози (Сах), вплив низьких температур атмосферного повітря призводить до змін в структурі гран хлоропластів. За температури  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$  у загартованих до холоду листків ширина міжтилакоїдного простору в гранах дещо варіює, але на відміну від хлоропластів контрольних листків тут не спостерігаються зміни структури тилакоїдів гран.

Після поступового охолодження листків до температури  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  і обробки Сах кількість тилакоїдів в розрахунку на грану була більшою у листків, оброблених  $0,1 \text{ М Сах}$ , порівняно з листками, обробленими  $0,02 \text{ М Сах}$ . Таке підвищення кількості тилакоїдів гран при  $0,1 \text{ М Сах}$  забезпечувало відповідне збільшення площі гран. Ширина міжтилакоїдного простору в гранах при  $0,02 \text{ М Сах}$  є меншою, а при  $0,1 \text{ М Сах}$  залишається незмінною у порівнянні з контролем.

Зі зниженням температури до  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  у контрольних хлоропластів виявлено хвилястість тилакоїдів гран і їх набряки та часткову фрагментацію гран. Порушення структури тилакоїдів гран призводять до нерівномірності ширини міжтилакоїдного простору. У листках, оброблених  $0,02\text{ M Сах}$ , ступінь набрякання та неоднорідність структури тилакоїдів гран подібні до контрольних. При цьому у хлоропластах кількість тилакоїдів на грану і товщина тилакоїдів змінюється незначно, а площа зрізу грани подвоюється порівняно з контролем завдяки значному збільшенню діаметра тилакоїдів гран. У листках, які попередньо обробляли розчином  $0,1\text{ M Сах}$ , при цій же температурі численні тилакоїди мають незначні ознаки набряку, але вони щільно упаковані у гранах. Незважаючи на зменшення товщини тилакоїдів і їх міжтилакоїдного простору, у гранах виявлено збільшення їх площі зрізу завдяки підвищенню кількості тилакоїдів. Це може бути результатом об'єднання близько розташованих сусідніх гран в єдину структуру. Наявність високих гран, утворених з щільно упакованих, відносно коротких не деформованих тилакоїдів, вказує на позитивний кріопротекторний ефект розчину  $0,1\text{ M Сах}$  та на пристосованість структури гран хлоропластів *G. nivalis* до впливу мінусових температур.

Отже, результати дослідження, викладені в дисертаційній роботі, розкривають певні якісні та кількісні зміни у структурі та функціонуванні продиховів, мітохондрій та хлоропластів, які забезпечують адаптацію дихання і фотосинтезу в листках *G. nivalis* до впливу низьких температур.

Встановлено, що за умов впливу мінусових температур (до  $-6,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) на вегетативному етапі розвитку низький рівень продихової транспірації, особливо у молодих листків, забезпечується завдяки повному закриттю продихів на адаксіальній поверхні та лише частковому їх відкриттю на абаксіальній стороні, тоді як під час квітнення ці показники збільшуються, що вказує про здатність листків ефемероїда ефективно підтримувати водозабезпечення та газообмін.

Виявлено, що на кутикулі формується нерівна поверхня кристалоїдами воску, які мають різноманітні форми і між якими утворюються увігнутої форми заглибини, що, очевидно, здатні розсіювати надмірний весняний потік фотонів, сприяючи захисту листків від перегріву і збереженню фотосинтетичного апарату від руйнування.

Показано, що за умов впливу низьких температур на вегетативному етапі розвитку листків на фоні змін форми мітохондрій важливого значення набуває збільшення об'єму крист, що пов'язано з підвищенням їх метаболічної активності. Ці структурні зміни супроводжуються максимальними значеннями інтенсивності загального та ціанід-резистентного дихання листків, що свідчить про існування зв'язку структурних змін мітохондрій з модифікаціями їх метаболізму.

Виявлено, що на ранніх стадіях вегетативного етапу розвитку листків в природних умовах за мінусових температур у хлоропластів переважає амебоїдна форма. Впродовж цього етапу відбувається поступове збільшення площ зрізів хлоропластів, гран та їх тилакоїдів, а також діаметра тилакоїдів. Це корелює з високим рівнем ефективного квантового виходу фотохімічного перетворення енергії, що вказує на існування зв'язку між структурними змінами в хлоропластах з особливостями функціонування ФСА ефемероїда у весняний період.

Експериментально встановлено, що у листків *G. nivalis*, які вирощувались в лабораторних умовах, стабілізація структури гранальної системи хлоропластів може забезпечуватись участю сахарози. Обробка екзогенною 0,1 М сахарозою сприяє збереженню інтактності гран, збільшенню кількості тилакоїдів та площі зрізу гран при температурах від  $-5$  до  $-15$  °C, що забезпечує захист від пошкодження фотосинтетичного апарату і його ефективне функціонування за умов впливу низьких температур.

Розроблений нами та запатентований “Пристрій для моніторингу температури листків рослин та фізико-кліматичних показників атмосферного повітря і ґрунту”, може використовуватися в подальших наукових

дослідженнях, присвячених з'ясуванню впливу основних кліматичних факторів на розвиток рослин.

**Ключові слова:** *Galanthus nivalis* L., листки, ультраструктура, мітохондрія, кристи, альтернативна оксидаза, хлоропласт, тилакоїд, грана, протопласти, низька температура, екзогенна сахароза



## СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові статті

1. **Федюк ОМ**, Білявська НО (2015) Ультраструктурні зміни мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. при вегетації за умов гіпотермії. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(35): 58-63. (Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавтором написано статтю).

2. Білявська НО, Подорванов ВВ, **Федюк ОМ** (2016) Сучасні уявлення про термогенез у рослин та його механізми. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(38): 28-45. (Здобувачем здійснено аналіз даних літератури і взято участь у підготовці статті до друку).

3. **Федюк ОМ**, Поліщук ОВ, Білявська НО (2016) Динаміка змін інтенсивності дихання листків *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) за різних значень низької температури і вологості повітря. Укр бот журн 73(3): 283-289. doi.org/10.15407/ukrbotj73.03.283. (Здобувачем проведено разом із співавторами дослідження, опрацьовано експериментальні дані та написано статтю).

4. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Золотарьова ОК (2017) Ультраструктурні особливості та стан фотосинтетичного апарату листків *Galanthus nivalis* L. на весняних етапах онтогенезу. Укр бот журн 74(5): 475-487. doi.org/10.15407/ukrbotj74.05.475 (Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавторами написано статтю).

5. **Fediuk OM**, Bilyavska NO, Zolotareva OK (2017) Effects of sucrose on structure and functioning of photosynthetic apparatus of *Galanthus nivalis* L. leaves exposed to chilling stress. Annals Society for Cell Biol XXI(3): 43-51. doi: 10.ANN/RSCB-2018-0002:RSCB (Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавторами написано статтю).

6. Білявська НО, **Федюк ОМ** (2018) Мікроструктура поверхні листків *Galanthus nivalis* L. на ранньовесняних етапах розвитку. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(44): 50-58. (Здобувачем спільно з співавтором проведено дослідження, взято участь в опрацюванні експериментальних даних та написанні статті).

7. **Fediuk OM**, Bilyavska NO, Zolotareva EK (2018) Effects of soil early-spring temperature on the morphometric parameters of mitochondria in *Galanthus nivalis* L. leaves. Plant Science Today 5(4): 149-154. dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.4.405 (Здобувачем самотійно проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавторами написано статтю).

## Патент України на корисну модель

**Федюк ОМ** (2017) винахідник; Пристрій для моніторингу температури листків рослин та фізико-кліматичних показників атмосферного повітря і ґрунту. Промислова власність “Винаходи. Корисні моделі. Топографії інтегральних мікросхем”. Патент №117136. 12 червня 2017.

### Тези конференцій

1. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Поліщук ОВ (2014) Вплив ціаніду і саліцилгідроксамової кислоти на активність дихання листків *Galanthus nivalis* L. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 9-12 вересня 2014; Україна. Умань. С. 115.

2. **Федюк ОМ**, Білявська НО (2015) Вплив низьких температур на ультраструктуру мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. Збірник наукових праць VI Науково-практичної конференції “Біологічні дослідження – 2015”; 11-12 березня 2015; Україна. Житомир. С. 46.

3. **Федюк ОМ**, Белявська НА, Полищук АВ (2015) Динамика дыхания листьев *Galanthus nivalis* L. под воздействием температуры и влажности внешней среды. Материалы V съезда биофизиков России; 4-10 октября 2015; Россия. Ростов-на-Дону; Т1. С. 379.

4. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Поліщук ОВ (2015) Динаміка тканинного дихання листків *Galanthus nivalis* L. в період вегетації. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 15-20 вересня 2015; Україна. Полтава. С. 119.

5. **Fediuk OM**, Polishuk OV, Bilyavska NO (2016) The effect of low growth temperature on the intensity of respiration and photosynthetic parameters in *Galanthus nivalis* L. (*Amaryllidaceae*) leaves. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 29 червня 2016; Україна. Херсон. С. 112.

6. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Золотарьова ОК (2017) Вплив деяких абіотичних факторів на динаміку температури листків *Galanthus nivalis* L. в природних умовах. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 5-10 вересня 2017; Україна. Луцьк. С. 91.

7. **Fediuk OM**, Bilyavska NO (2017) Qualitative and quantitative changes in chloroplasts of *Galanthus nivalis* L. on spring stages of ontogenesis. Moderating methodologicies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences; 2017 December 27-28; Poland. Lublin. P. 201-204.

8. **Fediuk OM**, Bilyavska NO, Zolotareva OK (2018) Grana's structure in mesophyll of leaves *Galanthus nivalis* L. under the exogenous sucrose and low temperatures influence. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 2-5 вересня 2018; Україна. Кирилівка. С. 89.

9. **Fediuk OM** (2018) Influence of Spring Temperatures and Soil Humidity on Leaves Temperature *Galanthus nivalis* L. in the Natural Environment. VII

International correspondence scientific specialized conference “International Scientific Review of the Problems of Natural Sciences and Medicine”; 2018 October 2-3; USA. Boston. P. 19-23.

## ANNOTATION

*Fediuk O.M.* Structural-functional peculiarities of chloroplasts and mitochondria in *Galanthus nivalis* L. leaves at low temperatures – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biology Sciences, specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – (091-Biology) – M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis presents the results of studies concerning ultrastructural and functional changes in chloroplasts and mitochondria, microstructure of the leaf surface and the stomata in *G. nivalis* leaves at cold conditions, as well as treated with various concentrations of exogenous sucrose.

Under natural conditions of the spring development of *G. nivalis*, the influence of low temperatures leads to morphological changes in the leaves, their rapid growth rate at the early vegetative stage (at length of leaf  $L_1=1,5$  cm) with daily temperatures from  $-6.8$  to  $-6.5$  °C. Along an increase in air temperature, the rapid increase in the area of leaves occurs, which is sharply slows down at the generative stage.

At all stages of spring development, epidermal cells of *G. nivalis* leaves were found to be covered with a thick layer of cuticle and epicuticular wax. The increased convexity of the cells neighboring to the stomata, which are immersed into the epidermis, seems to aim at protecting the stomatal apparatus from the destructive mechanical effect that occurs at the beginning of the young leaves germinating through the layers of fallen leaves and snow in early spring. Above the cuticle surface wax crystalloids are found in the form of plates of various shapes, grouped into star-shaped figures, which, together with sections of the surface of a concave shape, form a hilly protective leaf cover. Such a structure is obviously capable of refracting and dissipating the excess photon flux, which the leaves less trees early spring skip to the surface of the soil, and thus protect the leaves of *G. nivalis*.

The influence of low air temperatures under conditions of a powerful light flux results in the stomatal complete closing on the adaxial surface and only partially opening in 20% of the stomata on the abaxial surface of *G. nivalis* young leaves ( $L_1=1,5\text{cm}$ ), whereas during flowering, on the contrary, the percentage of open stomata on the adaxial side reaches 59 % and on abaxial – 30%. A thickened cuticle and a high percentage of closed stomata can be considered as an adaptation to the high insolation during early spring, aimed at reducing water loss and hindering xylem embolism.

Studies of the natural cold effects on the structure of mitochondria have shown that mitochondria remain intact throughout the entire spring period of ephemeroïd development. When leaves appear (at  $L_1=1,5\text{ cm}$ ), mitochondria are represented mainly by rounded forms with an insufficiently developed system of cristae and a matrix of moderate density; later (at  $L_1=3\text{ cm}$ ), the shape of the mitochondria becomes more elongated, the size of their cristae increases, which indicates the initial stage for intensive production of ATP. Before budding at temperatures from  $-3.6$  to  $+2.2\text{ }^\circ\text{C}$  (at  $L_1=7\text{ cm}$ ), the maximum increases in the length of mitochondria, the density of the matrix and the development of the cristae are observed. At the stage of budding (at  $L_1=13\text{ cm}$ ) and air temperature  $+8.5\text{ }^\circ\text{C}$ , mitochondria length decreases. During the flowering period (at  $L_1=15\text{ cm}$ ), most mitochondria have a rounded shape, a moderate number of shortened cristae and an electron-transparent matrix, showing signs of a drop in their functional activity.

The experimental data on the relationship between temperature, humidity and respiration of the leaves of *G. nivalis* show that the intensity of total respiration increases as much as possible at the final stage of the vegetative stage (at  $L_1=7\text{ cm}$ ) at a maximum value of relative humidity (88%) and a temperature of  $+2.2\text{ }^\circ\text{C}$ . At the same time, the connection of general respiration with the ambient temperature is weak. Compared to general respiration, the intensity of an alternative respiration maximizes at the vegetative stage and less at the budding stage. The high intensity of an alternative respiration at low temperatures is obviously caused by the need for

energy to ensure a certain level of metabolism, when the intensities of all biochemical reactions in the plant's body decrease.

The study of the features of ultrastructural changes in chloroplasts of *G. nivalis* induced by the effects of low atmospheric temperatures show that the chloroplasts' shape and location change. When leaves appear (at  $L_1=1,5$  cm), their chloroplasts have an elongated shape, sometimes with outgrowths (stromules). At subzero temperatures, contacts between chloroplasts, the endoplasmic reticulum and mitochondria are detected. In foliar starchless chloroplasts, low granae are present, local swelling of granal thylakoids and stromal thylakoids are noted. At the vegetative stage (at  $L_1=3-7$  cm), the presence of numerous amoeboid plastids with stromules can obviously be explained by their response to a low temperature.

The chloroplast section area reaches its maximum at the late vegetative stage (at  $L_1=7$  cm), before ephemeroïd flowering. Changing grana section area is more expressive; when air temperature changes from  $-6.8^\circ$  C to  $+1.4^\circ$  C from the beginning of growth to the late stage of the vegetative stage, the grana section area becomes more than twice as large, reaching a maximum. During flowering and fruiting, this parameter gradually decreases.

Application of the chlorophyll fluorescence method to dark-adapted leaves at photosynthesis activated by various photosynthetic photon flux densities (PPFD) (40, 80, 150, 350, 700 and  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) show that during spring when the leaves ( $L_1=1,5$  cm) appear and at the vegetative stage ( $L_1=3-7$  cm), even at low positive atmospheric air temperatures, the photosynthetic apparatus (PSA) is already formed, remains intact and functioning that is confirmed by the PSII indices' values.

Photochemical parameters of leaves differ between the vegetative and generative stages. In particular, when leaf is activated with  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPFD at the vegetative stage, the qP coefficient is lower compared to that at generative stage. The non-photochemical quenching coefficient qN at the same PPFD in the leaves at the generative stage exceeds its value at the vegetative stage that indicates the active transformation of the photosynthetic apparatus during ontogenesis.

With increasing PPFD to  $700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  the electron transfer rate increases, but when leaves are illuminated with  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPFD, their electron transport decrease that is probably due to the start of photoinhibition. At vegetative stage, the electron transport data obtained in our study indicate a high photosynthetic activity of the *G. nivalis* leaves at low and positive atmospheric air temperatures that is correlated with ultrastructural changes in chloroplasts.

It was established experimentally that in the leaves of *G. nivalis*, which grow under laboratory conditions, exogenous sucrose (Suc) can affect the structure of leaf chloroplasts under low temperatures. In the leaves treated with different concentrations of exogenous Suc, the influence of low temperatures leads to changes in the structure of the chloroplast granae. At a temperature of  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$  in cold-hardened leaves, the width of the interthylakoid space in the granae varies somewhat, but unlike the chloroplasts of the control leaves, there is swelling and undulation of the thylakoids in grana.

After gradual cooling of the leaves to a temperature of  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  and processing of Suc, the number of thylakoids per grana is greater in leaves treated with  $0.1 \text{ M}$  Suc compared to leaves treated with  $0.02 \text{ M}$  Suc. This increase in the amount of thylakoids in grana at  $0.1 \text{ M}$  Suc provides a corresponding granal area enlargement. The width of the interthylakoid space in the granae at  $0.02 \text{ M}$  Suc is smaller, whereas at  $0.1 \text{ M}$  Suc it remains unchanged compared with the control.

Following a gradual cooling to  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ , an undulation and swelling of granal thylakoids, as well as partial fragmentation of the granae, are found in control chloroplasts. Disturbance of the structure of granal thylakoids leads to uneven width of the interthylakoid space. In leaves treated with  $0.02 \text{ M}$  Suc, the degree of swelling and structural heterogeneity of the granal thylakoids are similar to those in the control leaves. At the same time, the number of thylakoids per grana and the thickness of thylakoids vary insignificantly in chloroplasts, and the area of the grana doubles compared to the control one due to a significant increase in the diameter of the granal thylakoids. In leaves pretreated with a  $0.1 \text{ M}$  Suc solution, numerous thylakoids have insignificant signs of swelling, but they are tightly packed in granae at the same

temperature. Despite the decrease in the thickness of the thylakoids and their interthylakoid space, an enlargement of the area of the grana as a result of an increase in the number of thylakoids was revealed. This may be the result of the association of closely related neighboring granae into a single structure. The presence of high grana, formed from tightly packed, relatively short, not deformed thylakoids indicates the positive cryoprotective effect of 0.1 M Suc and the adaptability of the structure of *G. nivalis* chloroplasts to cold temperatures.

Thus, the results of the research presented in the thesis reveal certain qualitative and quantitative changes in the structure and functioning of mitochondria, chloroplasts and stomata, which ensure the adaptation of the leaves of *G. nivalis* ephemeroid to low temperatures.

It has been established that when exposed to cold temperatures (up to  $-6.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) at the vegetative stage of development, a low level of stomatal transpiration, especially in young leaves, is ensured due to complete closure of stomata on the adaxial surface and only partial opening on the abaxial side, while these indices increase during flowering, which indicates the possibility of ephemeroid leaves to maintain effectively water supply and gas exchange.

It was revealed that an uneven surface is formed on the cuticle covered with wax crystalloids of various shapes, between which sites of the concave shape form pits. Such a humpy surface is obviously capable of dispersing the spring excessive flux of photons, helping to protect the leaves from overheating and to preserve the photosynthetic apparatus from destruction.

It has been shown that, along with the changes in a shape of mitochondria, an increase in the volume of the cristae is important when exposed to low temperatures at the vegetative stage, which is associated with a raise in their metabolic activity. These structural changes are accompanied by maximum values of the intensity of total and cyanide-resistant leaf respiration, which indicates the existence of a relationship between the structural changes in mitochondria and modifications of their metabolism.



It was revealed that the amoeboid form of chloroplasts prevails at the early stages of leaf development in natural conditions at sub-zero temperatures. During this stage, a gradual increase in the areas of the chloroplasts, grana and their thylakoids, as well as the diameter of the thylakoids occurs. This correlates with a high level of effective quantum yield of photochemical energy conversion, which indicates the existence of a link between structural changes in chloroplasts and the peculiarities of the PSA functioning in ephemeroid leaves at the spring period.

It was established experimentally on the leaves of *G. nivalis*, which were grown in the laboratory, that stabilization of the chloroplast granal structure can be achieved with the sucrose treatment of leaves at cold conditions. Such a pretreatment with exogenous 0.1 M Suc, which helps to maintain the granal intactness, to increase in the number of thylakoids and a cut area of the gran at temperatures ranging from  $-5$  to  $-15$  °C, which provides protection against damage to the photosynthetic apparatus and its effective functioning under low temperature conditions.

“A device for monitoring the temperature of plants’ leaves and the physical-climatic indices of atmospheric air and soil”, which was developed and patented by us, can be used in further scientific studies on the elucidation of the effects of the main climatic factors on plants.

**Keywords:** *Galanthus nivalis* L., leafs, ultrastructure, mitochondria, cristae, alternative oxidase, chloroplast, thylakoid, grana, stomata, low temperature, exogenous sucrose

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	22
<b>РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ КЛІТИННИХ ОРГАНЕЛ, ЯКІ ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ДИХАННЯ ТА ФОТОСИНТЕЗ В ЛИСТКАХ.....</b>	
1.1. Структурні і функціональні особливості мітохондрій рослин.....	28
1.1.1. Загальна характеристика ультраструктури мітохондрій .....	28
1.1.2. Роль мітохондрій в клітинному диханні .....	33
1.2. Структурні і функціональні особливості хлоропластів рослин .....	34
1.2.1. Загальна характеристика ультраструктури хлоропластів.....	34
1.2.2. Роль хлоропластів в фотосинтезі .....	40
1.3. Вплив низьких температур на структуру та функціонування мітохондрій і хлоропластів рослин .....	42
1.4. Основні шляхи адаптації рослин до низьких температур .....	49
1.4.1. Виділення теплової енергії .....	49
1.4.2. Ціанід-резистентне дихання .....	54
1.4.3. Застосування кріопротекторів .....	60
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	
2.1. Характеристика рослинного матеріалу .....	65
2.2. Загартування рослин і обробка сахарозою .....	68
2.3. Трансмісійна електронна мікроскопія .....	69
2.4. Сканувальна електронна мікроскопія.....	70
2.5. Світлова мікроскопія .....	70
2.6. Морфометрія.....	70
2.7. Інфрачервона термографія .....	71
2.8. Полярографія .....	72
2.9. Індукція флуоресценції хлорофілу.....	73
2.10. Статистична обробка кількісних даних.....	74

## РОЗДІЛ 3. МОРФОЛОГІЯ, АНАТОМІЯ ТА МІКРОСТРУКТУРА

ПОВЕРХНІ ЛИСТКІВ <i>G. NIVALIS</i> НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ .....	76
3.1. Морфологічні особливості листків .....	76
3.2. Анатомічна будова листків .....	79
3.3. Мікроструктура поверхні листків .....	81
3.4. Структурні особливості продихів .....	84

## РОЗДІЛ 4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ

МІТОХОНДРІЙ МЕЗОФІЛУ ЛИСТКІВ *G. NIVALIS*

ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР .....	92
4.1. Ультраструктурні зміни мітохондрій на різних етапах розвитку .....	94
4.1.1. Вплив температури атмосферного повітря .....	94
4.1.2. Вплив температури ґрунту .....	97
4.2. Зміни інтенсивності дихання на різних етапах розвитку .....	105

## РОЗДІЛ 5. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ХЛОРОПЛАСТІВ

НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ .....	111
5.1. Ультраструктурні зміни хлоропластів за низьких температур .....	112
5.2. Зміни функціональних показників фотосинтетичного апарату за низьких температур .....	118

## РОЗДІЛ 6. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ХЛОРОПЛАСТІВ,

## ЩО ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ЕКЗОГЕННОЇ САХАРОЗИ

ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР .....	126
6.1. Ультраструктурні зміни гран хлоропластів, що зазнали впливу екзогенної сахарози за низьких температур .....	126
6.2. Вплив екзогенної сахарози на функціональні показники фотосинтетичного апарату за низьких температур .....	131

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....

## ВИСНОВКИ.....

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....

## ДОДАТКИ.....

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

АС – коефіцієнт поглинання світлової енергії листком;

ETR – швидкість транспортування електронів;

$F_0$  – мінімальний рівень флуоресценції;

$F_m$  – максимальний рівень флуоресценції;

$F_v/F_m$  – максимальний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії в адаптованих до темряви листках;

Gn – генеративний етап розвитку рослини;

Gn1 – рання стадія генеративного етапу розвитку рослини;

Gn2 – середня стадія генеративного етапу розвитку рослини;

Gn3 – пізня стадія генеративного етапу розвитку рослини;

Gr – етап появи листків на поверхні ґрунту;

KCN – ціанід калію;

$L_d$  – довжина листка;

PFD – щільність потоку фотонів;

$Q_A$  – первинний хіноновий акцептор;

$q_N$  – коефіцієнт нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу;

$q_P$  – коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу;

$r$  – коефіцієнт кореляційного зв'язку показників;

Vg – вегетативний етап розвитку рослини;

Vg1 – рання стадія вегетативного етапу розвитку рослини;

Vg2 – пізня стадія вегетативного етапу розвитку рослини;

АО – альтернативна оксидаза;

АСМ – атомно силова мікроскопія;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АФК – активна форма кисню;

Г – грани хлоропласта;

ГА – глутаровий альдегід;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ЕР – ендоплазматичний ретикулум;

ЕТЛ – електронно транспортний ланцюг;

КО – клітинна оболонка;

Кр – кристи мітохондрій;

М – мітохондрія;

НАДН – відновлена форма кофермента нікотинамидадениндинуклеотида

НАДФ – нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат;

П – прорихи;

Пг – пластоглобула;

Сах – сахароза;

ТГ – тилакоїд грани;

ТС – тилакоїд строми;

$\Phi_{PSII}$  – ефективний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії;

ФСА – фотосинтетичний апарат;

ФСІ – фотосистема I;

ФСII – фотосистема II;

Хл – хлоропласт;

ЩПФ – щільність потоку фотонів;

Я – ядро.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Інтенсивний розвиток промисловості та збільшення антропогенного навантаження на природне середовище спричинюють швидкі зміни клімату. За умов зниження температури навколишнього середовища до низьких плюсових значень ефективність функціонування систем дихання і фотосинтезу більшості дикорослих та культурних видів рослин з тривалим весняно-літнім періодом розвитку в помірному кліматичному поясі може знизитись до критичного рівня і спричинити їх загибель [1]. Проте дикорослі ефемероїди, зокрема підсніжник білосніжний (*Galanthus nivalis* L.), протягом тривалої еволюції адаптувались до впливу низьких температур, тому успішно розвиваються і плодоносять, навіть ранньою весною, коли поверхневий шар ґрунту залишається ще промерзлим [2, 3].

У наукових працях, присвячених проблемі холодостійкості рослин [4, 5] успішність адаптації рослин до низьких температур пов'язують з механізмами, які забезпечують дихання та фотосинтез. Ключовими адаптивними процесами, пов'язаними з функціонуванням мітохондрій є: 1) рецепція сигналу гіпотермії; 2) зміна складу мембранних ліпідів; 3) активація фосфоліпази A<sub>2</sub>; 4) збільшення кількості вільних жирних кислот; 5) зміна редокс-стану мітохондрій; 6) термогенез; 7) формування і передача в ядро кальцієвого сигналу; 8) експресія відповідних генів; 9) синтез стресових білків [6, 7]. Однак взаємозв'язок між кількісними змінами структури мітохондрій у холодостійких рослин та ефективністю їх дихання за низьких температур залишається недостатньо дослідженим.

Подібно до мітохондрій, адаптивні зміни хлоропластів також надзвичайно важливі для забезпечення стійкості рослин до низьких температур. У більшості рослин ці органели чутливі до низьких температур. За дії низькотемпературного стресу вони можуть набрякати і руйнуватися [8], що призводить до пригнічення або припинення фотосинтезу. Низькі температури у холодочутливих рослин призводять до двох прямих ефектів на молекулярному

рівні: зниження ферментативної активності та зменшення лабільності мембран [9]. При охолодженні рослин світлові реакції фотосинтезу залишаються відносно стабільними, тоді як активність ферментів темнових реакцій знижується, що призводить до фотоінгібування фотосистеми I (ФСІ), а іноді фотосистеми II (ФСII) [10]. Аналіз результатів досліджень холодостійкості рослин показав, що успішність їх адаптації до впливу низьких температур залежить від фізіолого-біохімічних, молекулярно-генетичних змін в клітинах та структурно-функціональної реорганізації фотосинтетичного апарату [11].

Відомо, що високий вміст розчинних вуглеводів в клітинах характерний для зимуючих або акліматизованих до холоду рослин [12]. При цьому мало вивченим залишається вплив цукрів на структуру і функціонування окремих клітинних органел (у тому числі хлоропластів) за гіпотермії.

В цілому роль структурно-функціональних змін мітохондрій і хлоропластів у механізмах забезпечення стійкості листків ефемероїдних рослин до низьких температур досліджена недостатньо. Проте розкриття особливостей кількісних змін ультраструктури мітохондрій і хлоропластів та їх ролі в системах дихання і фотосинтезу у холодостійких рослин, має важливе значення для пошуку шляхів підвищення ефективності енергетичного обміну і стійкості цінних дикорослих та культурних рослин до низьких температур.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась в межах науково-дослідних тем відділу мембранології та фітохімії Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України за темами: “Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті” (2012-2016 рр.; № д/р 0112U000059), “Особливості енергетичного обміну в рослинних клітинах за різних рівнів вуглецевого забезпечення” (2012-2016 рр.; № д/р 0112U002315), “Координація біоенергетичних процесів у рослин за умов зростання вмісту атмосферного CO<sub>2</sub>” (2017-2021 рр; № д/р 0117U000180); “Структурні та метаболічні реакції рослин на глобальні зміни клімату” (2017-2021 рр.; № д/р 0117U004131).

**Мета і завдання дослідження.** Мета дослідження полягала у виявленні структурних перебудов хлоропластів, мітохондрій і продихів та їх зв'язку з ефективним функціонуванням фотосинтетичного апарату (ФСА) в ході адаптації листків *G. nivalis* до низьких температур.

Для досягнення мети визначено такі завдання дослідження:

1. Виявити зміни ультраструктури, інтенсивності загального та ціанід-резистентного дихання мітохондрій в клітинах мезофілу листків підсніжника білосніжного на різних етапах весняного періоду розвитку та за низьких температур.

2. Визначити особливості змін ультраструктури гран та фотохімічної активності хлоропластів листків на різних етапах весняного розвитку та за низьких температур.

3. Дослідити вплив різних концентрацій екзогенної сахарози на ультраструктуру гран хлоропластів та стійкість листків до низьких температур.

4. З'ясувати особливості змін мікроструктури поверхні листків і продихів на різних етапах весняного розвитку та за низьких температур.

**Робоча гіпотеза.** Стійкість листків *G. nivalis* до низьких температур у весняний період може бути пов'язана зі змінами структурно-функціональної організації хлоропластів і мітохондрій мезофілу листків, інтенсивності ціанід-резистентного дихання та накопичення кріопротекторів, зокрема, сахарози.

**Об'єкт дослідження:** структурно-функціональна організація фотосинтетичного апарату та системи дихання листків ефемероїдів на прикладі *G. nivalis*.

**Предмет дослідження:** структурні і функціональні зміни хлоропластів, мітохондрій, продихів листків *G. nivalis* на різних етапах весняного розвитку за низьких температур та кріопротекторні властивості сахарози.

**Методи дослідження:** ультраструктуру мітохондрій та хлоропластів в клітинах мезофілу при різних температурах і освітленості вивчали із застосуванням методу трансмісійної електронної мікроскопії. Особливості анатомічної будови листків досліджували із застосуванням методів світлової



мікроскопії. Мікроструктуру поверхні листків і продихів вивчали із застосуванням методу сканувальної електронної мікроскопії. За допомогою методу морфометрії виявляли кількісні параметри листків, мітохондрій, хлоропластів та їх структурних складових за різних умов температури і освітленості. Інтенсивність звичайного та ціанід-резистентного дихання виявляли із застосуванням полярографічного методу. Активність фотосистеми II на різних етапах розвитку листків ефемероїда визначали методом індукції флуоресценції хлорофілу. Температуру поверхні ґрунту та листків визначали із застосуванням методу спектрометрії теплового електромагнітного випромінювання. Статистичне опрацювання даних здійснювали із застосуванням комп'ютерної програми Statistica 12.0, достовірність результатів оцінювали з використанням t-критерію Ст'юдента.

**Наукова новизна отриманих результатів** полягає у виявленні кількісних та якісних змін мітохондрій мезофілу листків *G. nivalis*, які функціонально пов'язані з активацією ціанід-резистентного шляху дихання і забезпечують адаптацію до низьких температур. Вперше встановлено, що кількісні зміни в хлоропластах клітин мезофілу листків *G. nivalis* у весняний період забезпечують ефективне функціонування фотосинтетичного апарату за низьких температур. Встановлено, що сахароза здатна запобігати руйнуванню та фотоінгібуванню ФСА шляхом модифікації ультраструктури гран хлоропластів в листках *G. nivalis* за мінусових температур ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Вперше запропоновано використання рослин *G. nivalis* як модельного об'єкта для вивчення механізмів холодостійкості рослин.

**Практичне значення отриманих результатів** визначається тим, що розкрито структурну складову механізму адаптації мітохондрій та хлоропластів листків до низьких температур. Виявлені закономірності перебудови мітохондрій і хлоропластів в мезофілі листків ефемероїдів, що впливають на стійкість рослин до низьких температур, можуть бути використані в подальших наукових дослідженнях, присвячених вивченню енергетичних механізмів клітин, пошуку шляхів розв'язання проблем розвитку рослин в регіонах з

холодним кліматом. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані у вищих навчальних закладах, зокрема, при викладанні курсів клітинної біології, цитології, фізіології та екології рослин. Створений автором “Пристрій для моніторингу температури листків рослин та фізико-кліматичних показників атмосферного повітря і ґрунту” (патент на корисну модель № 117136, зареєстрований в державному реєстрі патентів України на корисні моделі 12.06.2017 р.) може використовуватися у подальших наукових дослідженнях, присвячених впливу різних температур на розвиток рослин.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно опрацьовано наукові джерела за темою дисертаційної роботи, обґрунтовано мету і завдання дослідження, освоєно відповідні методи і проведено експерименти в природних і лабораторних умовах. Отримано всі основні експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистичну обробку і узагальнення. Спільно з к.б.н. Поліщуком О.В. проводилися експерименти з визначення ролі ціанід-резистентного шляху дихання в адаптації ефемероїда до низьких температур. Спільно з науковим керівником визначено напрям дослідження, об’єкт і методи дослідження, виявлено структурні особливості поверхні листків і продихів, проведено обговорення, інтерпретацію, узагальнення отриманих результатів, а також підготовлено наукові статті, відредаговано текст дисертаційної роботи. Викладені у дисертаційній роботі ідеї, наукові висновки були сформульовані автором у співавторстві з науковим керівником. Частка особистої участі здобувача становить 85%.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні положення і результати дослідження апробувались, обговорювались і отримали схвалення на міжнародних наукових конференціях “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (Умань, 2014); “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (Полтава, 2015); “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (Херсон, 2016); “Актуальні проблеми ботаніки та екології” (Луцьк, 2017); “V съезд биофизиков России” (Ростов-на-Дону, 2015); “Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences” (Lublin, 2017); “Актуальні проблеми

ботаніки та екології” (Кирилівка, 2018); VII International correspondence scientific specialized conference “International Scientific Review of the Problems of Natural Sciences and Medicine” (Boston, 2018); Всеукраїнській науковій конференції “Біологічні дослідження” (Житомир, 2015); Відкритій лекції на науковому заході: “Дні науки” (Київ, 2016).

**Публікації.** Основні положення дисертаційного дослідження відображено у 16 наукових працях, з них 7 статей у фахових виданнях (дві – журналах з переліку Scopus) та 9 – у збірниках матеріалів і тез доповідей на наукових конференціях. Отримано патент України на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису об’єктів і методів досліджень, чотирьох експериментальних розділів, узагальнення результатів, списку використаних джерел, висновків та двох додатків. Робота викладена на 185 сторінках, містить 43 рисунки, 5 таблиць і 2 додатки. У списку використаних джерел 361 найменування.

## РОЗДІЛ 1

# СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ КЛІТИННИХ ОРГАНЕЛ, ЯКІ ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ДИХАННЯ ТА ФОТОСИНТЕЗ В ЛИСТКАХ

### 1.1. Структурні і функціональні особливості мітохондрій рослин

Мітохондрії у рослин виконують роль енергетичних станцій, які в анаеробних та аеробних умовах забезпечують клітини на 90% енергією у формі АТФ. Вони також беруть участь у синтезі залізо-сіркових кластерів, ліпідному обміні, підтримують гомеостаз кальцію, термогенез і активацію апоптозу [13].

#### 1.1.1. Загальна характеристика ультраструктури мітохондрій

В структурі мітохондрій виділяють чотири основні частини: зовнішню мембрану, міжмембранний простір, внутрішню мембрану та оточений внутрішньою мембраною простір (матрикс). Внутрішня мембрана може утворювати трубчасті структури (кристи), які розміщуються в середині матрикса і формують міжкристовий простір (рис. 1.1) [14].



Рис. 1.1. Модель структури мітохондрії з трубчастими кристами [15].

Зовнішня мітохондріальна мембрана, що охоплює органелу [16], є легко проникною для невеликих молекул. Це забезпечується присутністю в ній білків поринів, які утворюють канали для вільної дифузії молекул розміром не більше

6000 дальтон. Завдяки наявності іонів і невеликих молекул, склад міжмембранного простору подібний цитозолу [17].

В ультраструктурі зовнішньої мембрани мітохондрій розміщені численні спеціальні білкові комплекси (рис. 1.2) [18].

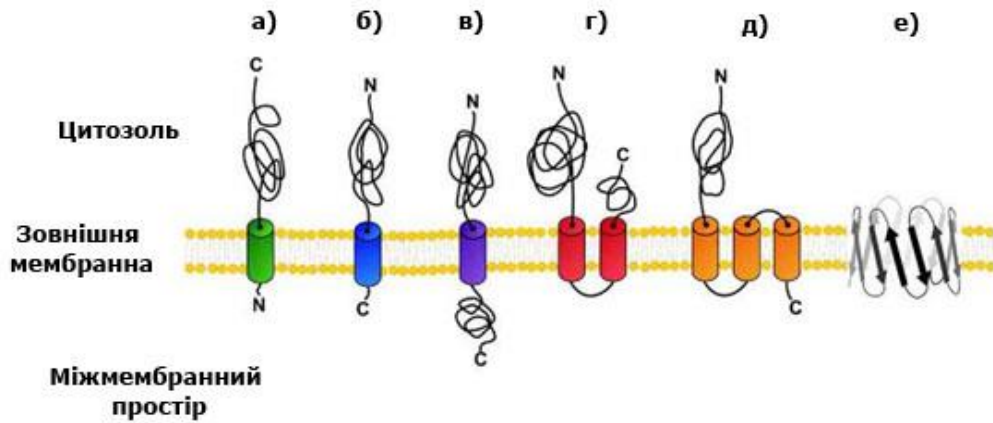


Рис. 1.2. Топологічна модель комплексу зовнішньої мембрани мітохондрій [18].

Білки пронизують мембрану один, два або більше разів і мають вигляд поліпептидів. Перший тип білків (Tom20, Tom70, OM45 і Mcr1) містить один трансмембранний сегмент на N-кінці (рис. 1.2 а). Їх більша складова частина розміщена в цитозолі, а менший N-кінцевий сегмент пересікає зовнішню мембрану. Для другого типу білків (Fis1, Tom5, Tom6, Gem1, Vcl-2 і VAMP-1B) характерне розміщення більшої N-кінцевої частини в цитозолі (рис. 1.2 б). Білки третього типу (Mim1 і Tom22) пересікають зовнішню мембрану один раз N-кінцевим доменом, спрямованим на цитозоль, а C-термінальний домен розміщений у міжмембранному просторі (рис. 1.2 в). Білки третього типу (Fzo1, Mfn1,2) проникають через мембрану двічі (рис. 1.2 г). Білки четвертого типу (Ugo1 та PBR), проходять крізь мембрану кілька разів (рис. 1.2 д). Білки п'ятої групи, (порин, Tom40, Tob55, Mdm10) можуть пересікати зовнішню мембрану у вигляді серії антипаралельних  $\beta$ -ниток, утворюючи структуру  $\beta$ -діжки (рис. 1.2 е) [18].

Зважаючи на те, що білки зовнішньої мембрани мітохондрій здійснюють транспортування молекул великого розміру, крізь мітохондріальні мембрани, а також беруть участь в апоптозі, поділі мітохондрій та їх злитті, важливість ролі зовнішньої мембрани мітохондрій у біогенезі, динамічній поведінці і морфології органели є очевидною [18].

Важлива транспортна роль також і у внутрішньої мембрани мітохондрій, яка містить понад 70% білків і забезпечує окислювальне фосфорилування, транспортування пірувату та жирних кислот. Внутрішня мембрана є непроникною для більшості іонів і великих молекул, що забезпечує підтримку градієнту протонів і окислювальне фосфорилування [16].

Розміщений у внутрішній мембрані мітохондрій електронно-транспортний ланцюг (ЕТЛ) є системою біологічного окислення. Її основними складовими є ферменти, коферменти, додаткові електронно-транспортні білки, які здійснюють дегідрування органічних субстратів та послідовний перенос відновлюваних еквівалентів на кисень через ряд проміжних переносників, тобто транспортерів електронів та протонів. Окремі білки та небілкові переносники відновлювальних еквівалентів ЕТЛ структурно об'єднані між собою в надмолекулярні мультиензимні комплекси, вбудовані в ліпідний матрикс внутрішньої мітохондріальної мембрани, що створює умови, необхідні для ефективного перебігу окислювально-відновлювальних реакцій [19].

Основними складовими ЕТЛ мітохондрій є п'ять білкових комплексів, які виконують роль переносників протонів і електронів, а також залізо-сіркові білки, що містять іони негемового заліза (у вигляді FeS), асоційовані з флавопротеїнами або цитохромом *b*. Крім білкових комплексів, функціонування ЕТЛ забезпечує декілька рухомих переносників – убіхінон (коензим *Q*) та цитохром *c* (рис. 1.3) [20].

Комплекс I (НАДН-дегідрогеназа, НАДН убіхінон редуктаза, НАДН коензим *Q* редуктаза) містить в структурі первинний акцептор електронів від НАДН, що забезпечує транспорт відновлюваних еквівалентів на убіхінон. Роль

проміжних транспортерів електронів в цьому комплексі виконують FeS-білки [19].

Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа, сукцинат убіхінон (коензим *Q* редуктаза), містить в структурі флавопротеїн ФАД-залежну сукцинатдегідрогеназу, асоційовану з FeS-білками, що окислює сукцинат, відновлюючи коензим *Q* [19].

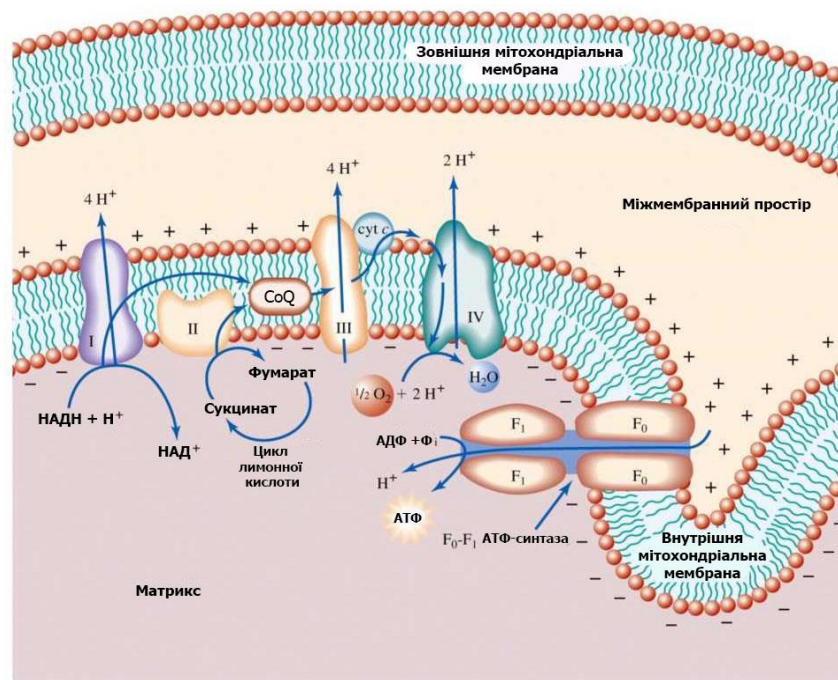


Рис. 1.3. Загальна схема електронно-транспортного ланцюгу внутрішньої мембрани мітохондрії [20].

Комплекс III містить в структурі цитохроми *b*, *c* та FeS-білок. Відновлена форма коензиму *Q* ( $\text{QH}_2$ ) за допомогою комплексу III передає на цитохром *c* лише електрони, а протони, які відщеплюються від  $\text{QH}_2$ , вивільнюються у мітохондріальній матрикс. В подальшому протони використовуються для утворення води [19].

Комплекс IV містить в структурі цитохроми *a*, і  $a_3$  (цитохромоксидазу), а також два іони міді змінної валентності ( $\text{Cu} - \text{Cu}^{2+}$ ), які каталізують кінцеву стадію біологічного окислення, тобто відновлення електронами молекулярного кисню [19].

Комплекс V або  $F_1F_0$ -АТФ-синтаза, є ферментом якому властиве обертання. Він розміщений у внутрішній мембрані мітохондрій поруч з комплексами I – IV. Його основними складовими є  $F_0$ -частина, занурена у внутрішню мітохондріальну мембрану та  $F_1$ -частина, розміщена над мембраною (рис. 1.4) [21].

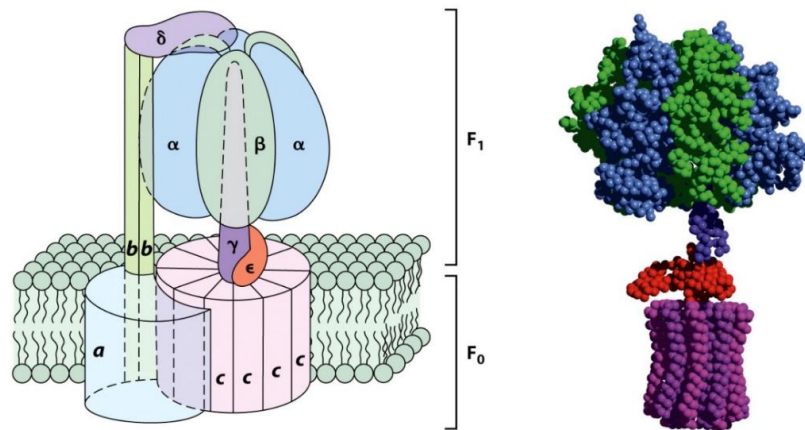


Рис. 1.4. Загальна модель  $F_1F_0$ -АТФ-синтази мітохондрій [20].

$F_0$  та  $F_1$  частини зв'язані з центральним та периферійним валами. Крім цього, з центральним валом з'єднаний ротор, що складається з  $c$ -субодиниць. Протонне обертання ротора з асоційованими білками центрального валу генерує обертальний момент і конформаційні зміни в каталітичному домені  $F_1$ -частини, необхідні для синтезу АТФ [21].

Вплив абіотичних факторів на АТФ-синтазу може зумовлювати зниження або припинення синтезу АТФ, тому для оптимізації функціонування АТФ-синтази у деяких видів рослин сформувались відповідні адаптаційні механізми. Вони забезпечують регулювання процесів зв'язування іонів, змін розміру кільця ротора і режиму постачання іонів до сайтів зв'язування, а також електричних та хімічних градієнтів [22].

Тривалі, багаторічні дослідження показали, що у вищих рослин синтез АТФ здійснюється в комплексах мітохондріальних мембран, для яких характерні складна структура і високі рівні функціонування. При цьому



залишаються недостатньо дослідженими структурні зміни мітохондрій та їх роль в адаптації до низьких температур.

### 1.1.2. Роль мітохондрій в клітинному диханні

Сутність клітинного дихання полягає у послідовній взаємодії складних окислювально-відновних реакцій. Серед основних етапів дихання, гліколіз здійснюється в цитозолі, а цикл Кребса і електронно транспортний ланцюг (ЕТЛ) на внутрішній мембрані мітохондрії. На етапі гліколізу в результаті анаеробного розкладання глюкози утворюється пірвіноградна кислота (піруват), яка зберігається в цитоплазмі. У подальшому, піруват транспортується в матрикс мітохондрій, де за aerobicних умов в циклі Кребса утворюються відновлювані НАДН і ФАДН<sub>2</sub> [23]. Далі, електрони послідовно транспортуються з НАДН і ФАДН<sub>2</sub> до комплексу I, комплексу II, убіхінону (Q), комплексу III, цитохрому C і комплексу IV [24] (рис. 1.5).

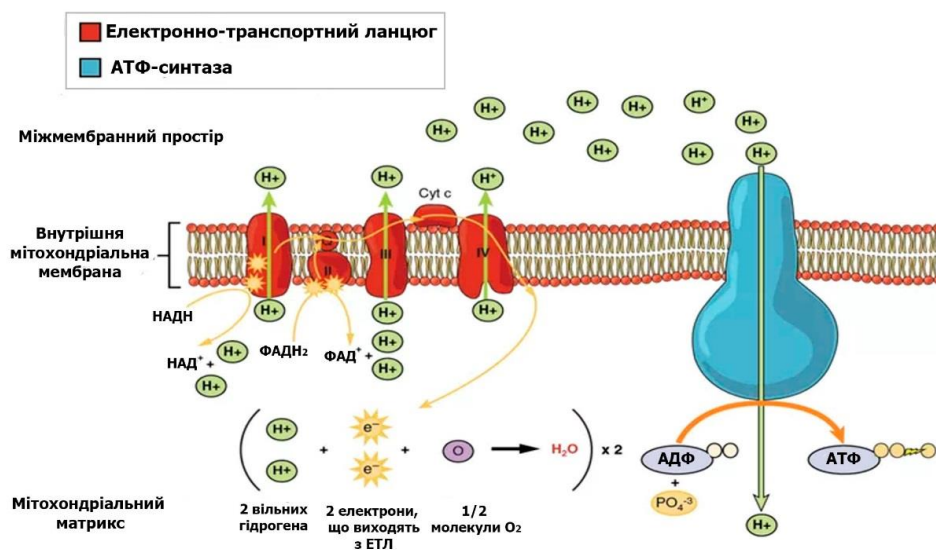


Рис. 1.5. Схема синтезу АТФ в електронно-транспортному ланцюзі внутрішньої мембрани мітохондрії [24].

В наслідок цього крізь внутрішню мембрану в міжмембранний простір викачуються протони (H<sup>+</sup>) і створюється трансмембранний електрохімічний протонний градієнт [25]. З комплексу IV електрони надходять до молекул кисню (O<sub>2</sub>), в результаті чого ці молекули розпадаються на атоми, які

з'єднуються з іонами  $H^+$  і формують молекули води. При цьому, переміщені раніше з матриксу в міжмембранний простір протони, транспортуються АТФ-синтазою знову в матрикс. В результаті надходження потоку протонів виділяється енергія, яка використовується для приєднання фосфату до АДФ, тобто для синтезу АТФ [24].

## **1.2. Структурні і функціональні особливості хлоропластів рослин**

Хлоропласти – цитоплазматичні органели, оточені оболонкою, які є місцем фотосинтезу у рослинах і водоростях. Вони походять від ціанобактерій, які встановили симбіотичний зв'язок з еукаріотичною клітиною-хазяїном близько 1,2 мільярда років тому. Хлоропласти в листках рослин з'явилися та еволюціонували в напрямку вдосконалення систем ефективного перетворення енергії фотонів у форму доступну для всіх живих організмів на Землі. Крім цього, у клітинному метаболізмі хлоропласти беруть участь у продукуванні різноманітних первинних і вторинних метаболітів, що визначає їх провідну роль у забезпеченні життя [26].

### **1.2.1. Загальна характеристика ультраструктури хлоропластів**

Хлоропласти розміщені, насамперед, в клітинах листків, а також в стеблах та плодах. Крім класичної еліпсоїдної форми, в клітинах різних тканин у рослин можуть знаходитись хлоропласти округлої, полігональної або амебоїдної форм з присутніми або відсутніми виростами, наповненими стромою (стромулами) [27].

З зовнішньої сторони хлоропласти оточені двомембранною оболонкою. В стромі хлоропласту розміщена розвинена система тилакоїдів і мембранних компонентів. Тилакоїди являють собою обмежені внутрішньою мембраною компартменти усередині хлоропластів. Вони утворюються мембранами, що оточують просвіт тилакоїду (люмен). Окрім тилакоїдів гран та строми, в хлоропластах можуть бути присутніми зерна крохмалю. Ще одним компонентом структури хлоропластів є пластоглобули [27].

Грани – це циліндричні стопки тилакоїдів, які мають форму дисків (рис. 1.6). Хлоропласти можуть містити від декількох до 100 гран. Грани сполучаються між собою за допомогою тилакоїдів строми, які іноді називають також міжграновими тилакоїдами [28]. Гранальні та стромальні тилакоїди розрізняються за білковим складом.

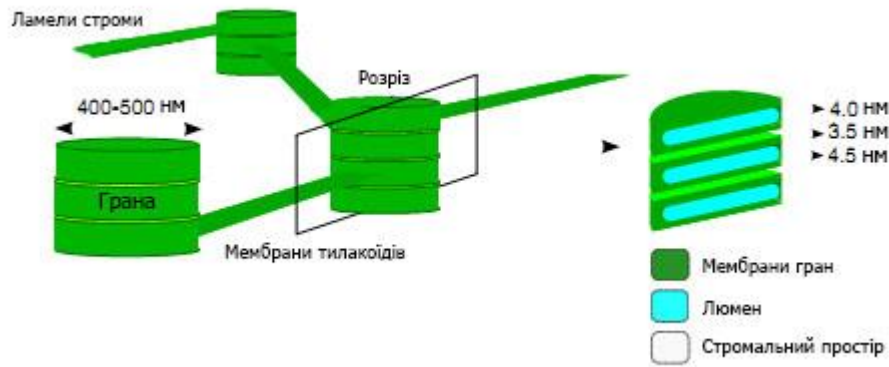


Рис. 1.6. Розміри та організація тилакоїдних мембран грани біля 4 нм товщиною з люменом шириною 3,5 нм та стромальним проміжком – 4,5 нм [29].

В гранах розрізняють три різні області: основна грана, термінальні тилакоїди по краях грани, кінцеві ділянки мембран на боковій поверхні грани. У багатьох видів фракція гранальних мембран, включаючи основну грану і термінальні тилакоїди грани, складає 80% тилакоїдної мембрани і є постійною величиною [30]. Діаметр гран у різних видів вищих рослин також є постійною величиною, яка лише трохи варіює за нестресових умов в межах 400-500 нм (див. рис 1.6) [31, 32]. Таким чином, вважається, що діаметр гран є еволюційно постійним, хоча значення цієї стабільності невідомо [33]. Грана містить 80% хлорофілів в тилакоїдній мембрані і вони щільно упаковані з іншими білками. Останнє має значний вплив на дифузійні процеси, які необхідні для різноманітних фотосинтетичних функцій.

В мембранах тилакоїдів відбувається оксигенний фотосинтез, до якого залучені дві фотосистеми (ФСII і ФСI), з'єднані цитохром b6/f комплексами та

мобільними транспортерами електронів. Кожна фотосистема містить внутрішню пігмент-білкову антену для збирання світла та реакційний центр, де знаходяться кофактори, пов'язані з електронним транспортом. Крім того, допоміжні антени, пов'язані з фотосистемами, утворюють великі пігмент-білкові суперкомплекси. Енергія світла збирається пігментами антени та передається до реакційних центрів, у яких відбувається перший етап перетворення енергії. В результаті фотохімічних процесів в реакційному центрі ФС із води виділяються електрони і в кінцевому рахунку вони доставляються на НАДФ. Це також породжує протонний градієнт через тилакоїдну мембрану, який використовується для синтезу аденозинтрифосфату (АТФ). НАДФН і АТФ, які продукуються через ці реакції, потім беруть участь у запуску клітинного метаболізму, у тому числі, циклу Кальвіна-Бенсона.

ФСII в основному розміщується в гранях [34–36]. Стромальний проміжок в грані досягає близько 3,5 нм (див. рис. 1.6), в результаті чого виключається присутність ФС I і АТФase в гранях, оскільки їхні виступи є більшими за розмірами [37]. Через це вони концентруються у стромальних ламелах. Відокремлення ФСII і ФСI вводить латеральну гетерогенність в тилакоїдні мембрани рослин і зелених водоростей. Ширина тилакоїдного просвіту (люмену) при помірному освітленні становить 4,5 нм (див. рис. 1.6), і вона змінюється за різних світлових умов. Ця мінливість являє собою важливий аспект функціональної гнучкості тилакоїдної мембрани. На відміну від фотосистем, розташування цитохром b6/f комплексу все ще дебатуються. Вважалось, що він рівномірно розподілений по всій тилакоїдній мембрані [38]. Недавнє дослідження з використанням напівкількісного протеомного підходу однак показало збагачення стромальних ламел цитохром b6/f комплексами [39]. Інше дослідження, проведене методом атомної силової мікроскопії (АСМ), виявило цитохром b6/f комплекси в нанодоменах з ФСII в гранальних областях [40]. Імунолокалізація цитохром b6/f комплексів з використанням анти-Rieske антитіл показало збагачення цитохром b6/f комплексами термінальних тилакоїдів гран [33]. Де саме зустрічається цитохром b6/f комплекси в

тилакоїдних мембранах, таким чином, залишається недоведеним, хоча його точне місцезнаходження є важливим для довгострокових дифузійних процесів.

Варто зауважити, що складна мембранна структура гран рослин не є суттєвою для кисневого фотосинтезу, піднімаючи питання про функціональні переваги гранальної будови. Можливо, винятковим прикладом може служити вид *Alocasia macrorrhiza*, який росте при низькому освітленні та має до 160 тилакоїдів на грану [41]. Раніше вважалося, що утворення гран полегшує світлозбирання та його регуляцію за допомогою нефотохімічного гасіння (NPQ), таким чином захищаючи ФСII від фотопошкодження [42, 43]. Складання мембран в грани також описано як засіб фізично відокремити повільно працюючу ФСII від швидкодіючої ФСI, а отже, запобігти накопиченню надлишку енергії збудження [44]. Далі пропонувалося, що латеральна гетерогенність завдяки формуванню гран уникає конкуренції між лінійним та циклічним потоками електронів [34], оскільки індукція циклічного потоку електронів потребує сильної регуляції [45]. Однак більшість ціанобактерій, тилакоїди яких не показують ні латеральної неоднорідності, ні об'ємного укладання, має ефективний NPQ механізм [46, 47]. Отже, запобігання надлишку світлозбирання та його оптимізації не є достатньою причиною для розвитку гран [48]. Інше зауваження, що виступає проти зв'язку між утворенням гран та ефективним світлозбиранням – демонстрація, використовуючи штучно роз'єднані мембрани гран, що поперечна передача енергії між мембранами не є значною, але перенесення енергії в основному проходить латеральним шляхом вздовж площини мембрани [49]. Вважається [48], що еволюція збирання мембран в грани може представляти компроміс між ефективним світлозбиранням відносно великою антеною LHC та дифузійною свободою пластохінона в збагачених ФСII мембранах, оскільки латеральне пакування LHC II навколо ФСII може обмежувати дифузію пластохінона.

Суперкомплекси LHC II–ФС II окремі і суперкомплекси LHC II–ФСII з додатковими слабко зв'язаними тримерами LHC II (приблизно по три на реакційний центр ФСII) займають відповідно близько 50% і 80% від загальної

площі гранальних мембран [50]. Дослідження, проведені за допомогою електронної мікроскопії та атомної силової мікроскопії підтверджують ці дані [51, 52], показуючи, що частка білка в грані є постійною, а саме, від 70 до 80%.

Щільність усього білка мембрани тилакоїду складає близько 69% [52]. Бракує точних даних щодо щільності білка в стромальних тилакоїдах, але припускається, що вона на третину нижче, ніж у гранальних. Густа упаковка білка в мембранах гран вигідна для світлозбору, оскільки сонячне світло є слабким джерелом енергії у молекулярних масштабах [53]. Висока концентрація пігментів і щільність білка є корисними властивостями за умов ефективного поглинання та збирання світла, відповідно, підтримання необхідної надшвидкої передачі енергії та високого квантового виходу ФСII [50, 54]. Показано, що зниження густини білка від 80% до приблизно 70% збільшує світлозбір на ФСII та зайнятість реакційних центрів ФСII, вказуючи на те, що мембрани гран регулюють щільність їх білка до 70% для забезпечення ефективності світлозбору [54]. Проте подальше зниження густини білка за рахунок ліпідів, викликає розділення комплексів ФСII та ЛНС II. Зниження екситонного зв'язку між цими комплексами призвело до зниження квантової ефективності ФСII, вказуючи на значення молекулярного скупчення і оптимальної щільності упаковки білка біля 70% [50, 54, 55].

Молекулярне скупчення може бути не вигідним, оскільки це заважає процесам латеральної дифузії [56]. Дифузійний простір, доступний для молекул, визначається сумою перешкод в певній (мембранній) області і розміром дифундуючих часток [57]. У двошаровій мембрані гран ФСII і ЛНС II викликають скупчення, в той час як у просвіті водорозщеплюючі комплекси ФСII являють собою перешкоди для дифузії, ускладнюючи дифузію пластохінонів та ксантофілів через мембрани.

Як згадувалося раніше, діаметр гран є постійним у багатьох видів рослин. Причини, що зумовлюють таку стабільність залишаються не недостатньо дослідженими. Теоретичні обґрунтування показують, що діаметр грани менше 400 нм може зумовлювати появу високих статистичних коливань

співвідношень ЛНС II: ФСII та ФСII: цитохром b6/f комплекси [50]. Це може призводити до зниження ефективності передачі енергії збудження від ЛНС II до ФСII. Далі, випадковий розподіл комплексів ФСII міг би знизити ефективність електронного транспорту [51] або призвести до надмірної редукції пулу пластохінонів, що, у свою чергу, викликає, серед інших причин, фотоінгібування. На відміну від цього, більший діаметр гран призведе до подовження часу дифузії. Звідси грана діаметром 500 нм може відобразити компроміс між оптимальним складом білків та ефективним процесом латеральної дифузії [50]. Цю гіпотезу, сформульовану за допомогою комп'ютерного моделювання, було важко перевірити, враховуючи відсутність відповідної біологічної модельної системи. Це нещодавно змінилося з появою рослин *Arabidopsis thaliana*, мутантних по білку для кривизни тилакоїду 1 (CURT1).

CURT1 – це високо консервативна родина тилакоїдних білків, якими збагачені термінальні тилакоїди гран. Вони дозволяють створювати кривизну мембрани на краях гран. Чотирикратний нокаут-мутант арабідопсиса, у якого відсутні всі чотири білки CURT1 (A, B, C і D), має діаметр гран в три рази більший, з меншою кількістю гранальних стопок, ніж рослини дикого типу [58]. Надекспресуюча лінія *curt1a*, з іншого боку, має менший діаметр гран, але з більшою кількістю мембран на грану [58]. *Curt1abc*-нокаутні рослини мають нижчий рівень ефективності фотосинтезу та менший пул пластохінонів. Методика кінетики індукції флюоресценції та вимірювання однократного обертання P700 показують, що завдяки більшому діаметру грани відстань пластохінонів до цитохром b6/f комплексу стає надто довгою і ефективність дифузії знижується. Внаслідок цього рівень пулу пластохінонів ще більше знижується. Надекспресуюча лінія, навпаки, має нижчу квантову ефективність ФСII та зменшену біомасу. Це дозволяє припустити, що такі дефекти виникають внаслідок неоптимального діаметра гран. Однак, пул пластохінонів дещо більше окислюється і ефективність відновлення їх пулу у надекспресуючій лінії є трохи вищою, ніж у дикому типі. На сам кінець,

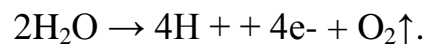
діаметр грани, очевидно, визначає ефективність електронного транспорту, опосередкованого пластохінонами [33].

Таким чином, динамізм фотосинтетичного апарату дозволяє забезпечити його безперебійну роботу та збереження за умов змін навколишнього середовища та стадій розвитку. Динамічні реакції тилакоїдів включають зміни в їх структурі та функції у часовому інтервалі від секунд до днів. Глибоке розуміння пристосувальних реакцій тилакоїдів до дії абіотичних факторів повинно виявити важливі шляхи та механізми, які можуть стати об'єктами для перепрограмування фотосинтезу у сільськогосподарських культур та біопаливних водоростей [59, 60].

### 1.2.2. Роль хлоропластів в фотосинтезі

Хлоропласти відіграють ключову роль у забезпеченні світлозалежних (світлових) і світлoneзалежних (темнових) реакцій фотосинтезу.

Світлозалежні реакції здійснюються в комплексах ФСII, які розміщені в тилакоїдних мембранах хлоропластів, де потік світла використовується для розщеплення молекул води (фотолізу) за таким рівнянням [61]:



В результаті фотолізу здійснюється запасання водню і електронів, а також надходження кисню в атмосферу, як побічного продукту (рис. 1.7).

Електрони, що надходять із зовнішнім світловим потоком, необхідні для заміни інших електронів, розміщених в реакційному центрі фотосистеми II рослин, а також для фотоактивування хлорофілу-*a* і здійснення нециклічного фосфорилування. Від молекул хлорофілу електрони переходять до реакційних центрів, де енергія електронів витрачається на синтез АТФ та відновлення НАДФ, які в подальшому використовуються в циклі Кальвіна-Бенсона-Бесема (рис. 1.8) [61].

У світлoneзалежних (темнових) 13 реакціях циклу Кальвіна-Бенсона-Бесема беруть участь 11 різноманітних ферментів, які їх каталізують [62] і забезпечують асиміляцію CO<sub>2</sub> [63].



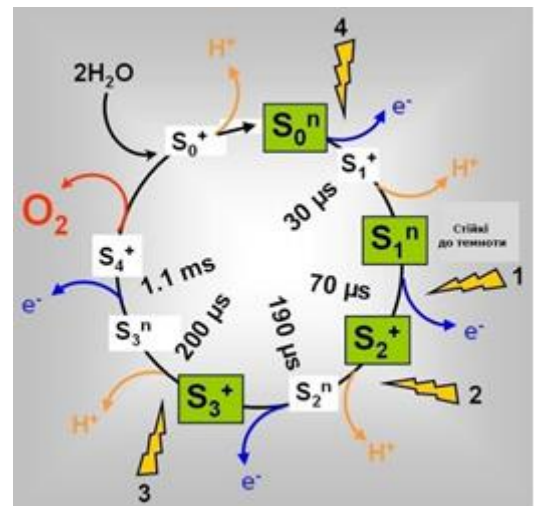
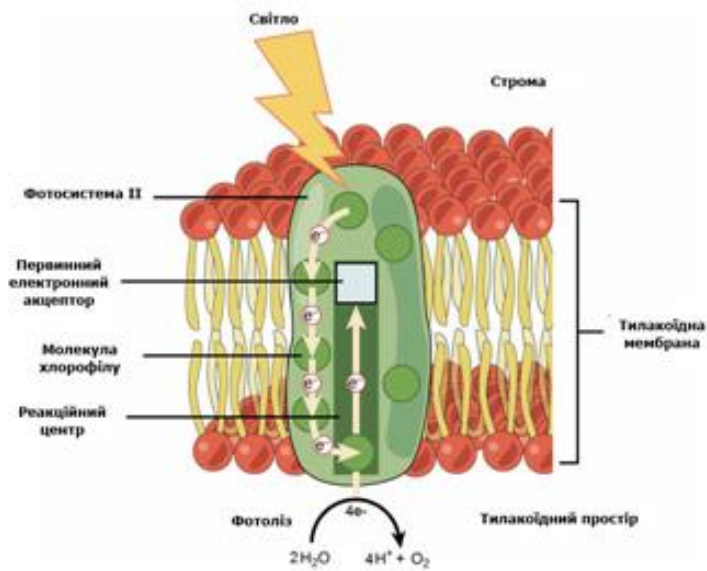


Рис. 1.7. Схема здійснення світлозалежного фотолізу у рослин [61].

На відміну від фотолізу, цикл Кальвіна-Бенсона-Бесема лише опосередковано залежний від світла, оскільки необхідні для нього енергоносії (АТФ і НАДФН) утворюються в результаті здійснення світлозалежних реакцій. В межах вищезгаданого циклу виділяють три основні етапи: фіксацію, редукцію і регенерацію [64].

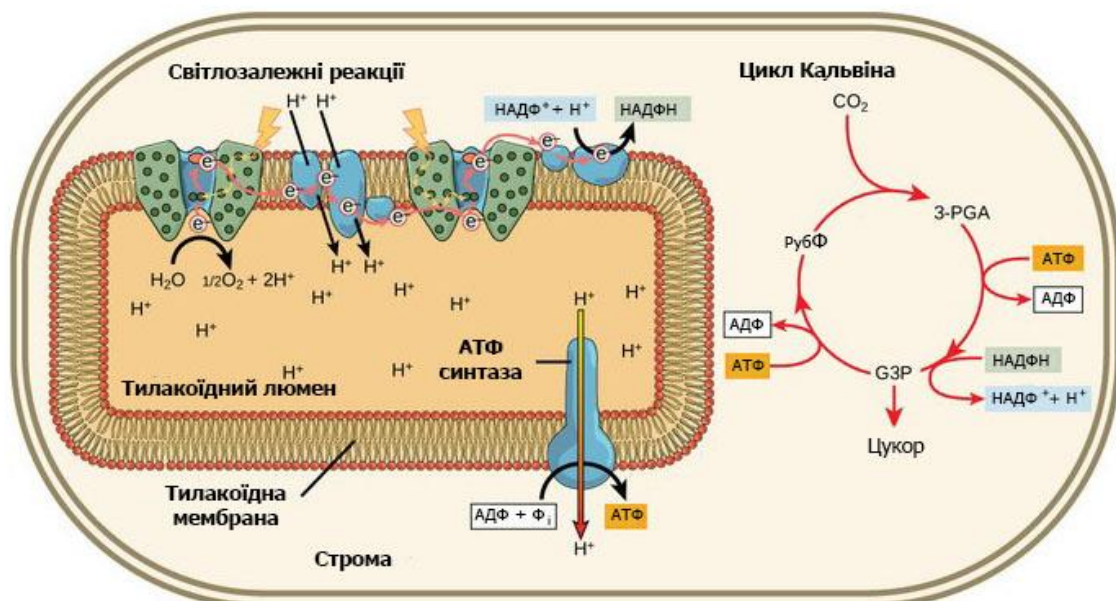


Рис. 1.8. Загальна схема світлозалежних і світлоне залежних реакцій в хлоропластах рослин [64].

На початковому етапі фіксації  $\text{CO}_2$ , присутній в стромі фермент рибулозобісфосфаткарбоксилаза (RuBisCO) каталізує реакцію між рибулозобісфосфатом (RuBP) і молекулами  $\text{CO}_2$ , які надходять крізь продихи листка. В результаті здійснення одного циклу Кальвіна з одної молекули  $\text{CO}_2$  і рибулозобісфосфату утворюються дві молекули 3-фосфогліцеринової кислоти (3-PGA). При цьому, число атомів вуглецю залишається незмінним, оскільки атоми рухаються і утворюють нові зв'язки під час реакцій (3 атоми із  $\text{CO}_2$  + 15 атомів із  $3\text{RuBP} = 18$  атомів у 3 атомах 3-PGA) [64].

На етапі редукції здійснюється перетворення шести молекул 3-фосфогліцеринової кислоти в шість молекул гліцеральдегід-3-фосфату (G3P) з використанням синтезованих на світловій фазі фотосинтезу шести молекул АТФ та НАДФН. При цьому вивільнюється енергія, і АТФ в результаті втрати кінцевого атома фосфату перетворюється на АДФ, а НАДФН втрачає атом водню і перетворюється у НАДФ<sup>+</sup>. Ці молекули використовуються в подальшому повторно у світлозалежних реакціях [64].

На етапі регенерації з попередньо утворених шести молекул гліцеральдегід-3-фосфату (G3P) п'ять залишаються в циклі для регенерації рибулозобісфосфату (RuBP) і тільки одна з них виходить з циклу Кальвіна, для забезпечення утворення інших сполук, необхідних для розвитку рослини. Зважаючи на те, що до складу однієї молекули гліцеральдегід-3-фосфату (G3P) входить три молекули вуглецю, для утворення такої кількості вуглецю цикл Кальвіна повторюється тричі. При цьому витрачається раніше синтезований АТФ [64].

### **1.3. Вплив низьких температур на структуру та функціонування мітохондрій і хлоропластів рослин**

Багаторічними дослідженнями особливостей будови та функціонування енергетичних органел, проведеними на багатьох видах рослин, були з'ясовані та узагальнені закономірності впливу низьких температур на ультраструктурному та молекулярному рівні.

Вплив низьких температур повітря може зумовлювати появу різноманітних ефектів в клітинних компартментах рослин, зокрема, у мітохондрій [65, 66]. Протягом еволюції більшість мітохондріальних генів у рослин перемістилися в ядерний геном, тому мітохондріальні геноми кодують тільки обмежену кількість білків [67]. Зважаючи на це, низькі температури здатні значно впливати на баланс експресії мітохондріальних та ядерних геномів, що відображається на будові білкових комплексів (Cs) і суперкомплексів (SC) [66, 68].

Повідомлялось, що у рослин арабідопсиса низькі температури здатні знижувати вміст мРНК альтернативних оксидаз (АО) та значно інгібувати накопичення внутрішніх транскриптів НАДФН-дегідрогенази [69]. Крім цього, може змінюватись кількість мРНК, які кодують роз'єднуючі білки (UCP1 і UCP2) (рис. 1.9) [70], а також змінюватись регуляція переносу електронів в комплексах дихального ланцюгу [71] і узгодженість взаємодії різноманітних мітохондріальних білків [72]. Виявлено, що низькі температури можуть впливати на регуляцію енергетичних і метаболічних потреб рослин, зокрема, змінювати співвідношення АТФ / АДФ та потреби мітохондрій у вуглецю [73].

Прояв такого впливу низьких температур здебільшого зумовлений інгібуванням гліциндекарбоксилази (GDC) і серингідроксиметилтрансферази (SHMT) [74–77]. В цих умовах можуть зазнавати змін три ізоформи роз'єднуючих мітохондріальних білків (PUMP1, PUMP4, PUMP5) [78] і білок CSP 310 пшениці [79], який шунтуванням електронів від реакційних центрів CI до CIV, здійснює обхід убихінона і реакційного центру CIII [80]. Повідомлялось, що чутливий до впливу низьких температур білок UCP1 в листках рослин здатний зберігати окислювально-відновлювальний потенціал мітохондріального електронно-транспортного ланцюгу для підвищення ефективності фотосинтезу [81].

Вплив на мітохондріальну структуру може проявлятися також у змінах рідинних властивостей мембран, проникності мембран, окисленні ліпідів і надмірному протеолізі [75, 76].

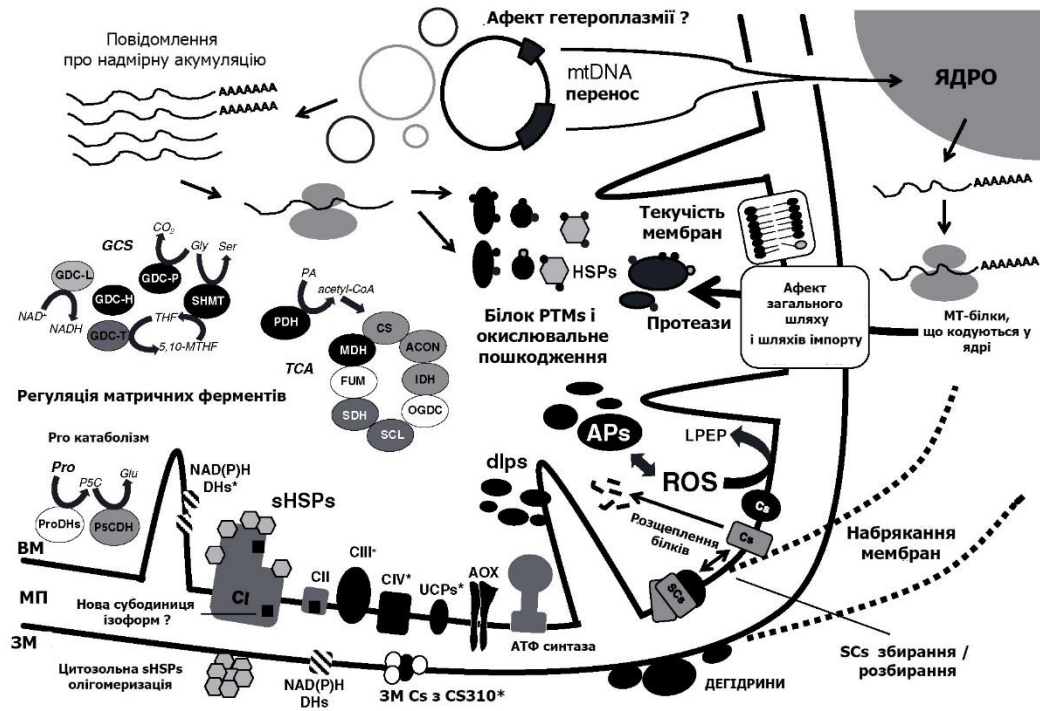


Рис. 1.9. Схема основних реакцій і процесів, які виникають в онтогенезі мітохондрій у рослин за умов впливу низьких температур [70].

При цьому залишаються недостатньо дослідженими стехіометричні зміни в мітохондріальному комплексі рослин [72] та роль структурних змін мітохондрій в адаптації до впливу низьких температур. Дослідження в цьому напрямі сприятимуть формуванню більш цілісної картини розуміння важливості структурних змін у механізмах адаптації мітохондрій до впливу низьких температур [70].

Низька температура є одним з ключових абіотичних факторів, які пригнічують ріст рослин. Серед клітинних механізмів, найчутливішими до швидкого зниження температури є рух цитоплазми і фотосинтез, зокрема, функціонування тилакоїдів в хлоропластах. Низька температура особливо небезпечна для хлоропластів, оскільки її вплив здатний зумовлювати появу модифікацій ультраструктури хлоропластів [82], подібних модифікаціям, що виникають при старінні клітин.

В своєму класичному огляді Креч і Вайс [82] вперше систематизували ознаки впливу низьких температур на клітини чутливих до охолодження рослин. Вони зазначали, що першим проявом такого впливу є набрякання хлоропластів, порушення і розширення тилакоїдів, зменшення розмірів і кількості гранул крохмалю, формування дрібних везикул з внутрішньої мембрани оболонки хлоропласта (периферичного ретикулуму). Тривале охолодження призводить до накопичення ліпопротеїдних крапель (пластоглобул), потемніння строми, розпакування гран, порушення оболонки хлоропласта, змішування строми з цитоплазмою; гранули крохмалю з часом продовжують зменшуватися, а в рослинах, стійких до охолодження, вони повністю зникають. Крім перерахованих вище ознак, повідомлялося про дезорієнтацію гран по відношенню однієї до іншої, викривлення і згинання стовпців гран з подальшим розпадом і зникненням тилакоїдів строми (див. посилання в огляді [82]).

Стосовно рослин, що походять з Арктики і Антарктиди, численними дослідженнями показано, що їх клітини характеризуються більш високим рівнем метаболічної активності, порівняно з рослинами, які ростуть у помірному кліматі [83]. Існування, індивідуальний розвиток і репродуктивні структури цих судинних рослин вказують на те, що ці організми адаптовані до впливу суворих низькотемпературних умов. У них сформовані численні адаптивні механізми різної ефективності для протидії або боротьби з негативними наслідками впливу низьких температур. З'ясовано, що в Арктиці існує 2220 видів судинних рослин [84], при цьому, з них тільки два види, зокрема, *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) і *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) змогли природним шляхом колонізувати прибережні частини Антарктики [85]. Ці дані вказують на те, що антарктичні рослини відрізняються від інших холодостійких рослин здатністю розвиватись за умов впливу низьких температур протягом року. При цьому, вони ростуть і можуть розмножуватися при постійних низьких температурах (від 5 до 7 °C), а фотосинтез їх листків є активним, навіть при нульових температурах [86].

У рослин *D. antarctica*, що ростуть в прибережних районах Антарктики, хлоропласти мезофільних клітин листків мають неправильні форми, з виростами та кишнями або інвагінаціями всередині органел, що сприяє збільшенню поверхні хлоропластів і кількості речовин, які є складовими обміну між хлоропластами і цитоплазмою або іншими органелами [87]. Близькі ознаки ультраструктури хлоропластів з деформованими поверхнями виявлено також в мезофільних клітинах рослин *C. quitensis*, які вилучали з ґрунту в місцях їх природного поширення в Антарктиці. Деформації мали форму інвагінацій, тісно оточених поодинокими мітохондріями, або довгих виростів, що містять строму (стромули). У хлоропластах рослин *C. quitensis* були присутні невеликі крохмальні зерна та численні пластоглобули [88].

За сприятливих умов для росту і розвитку рослин, серед загальної кількості пластид у незначної їх частини можуть виникати стромули. Несприятливі умови здатні збільшувати частоту формування стромул [89–94]. Функції стромул були предметом кількох припущень і дебатів [89, 92, 95–97]. Вважається, що стромули, які відростають від основного тіла пластиди, збільшують інтерактивну поверхню між пластидою і сусідньою цитоплазмою і сприяють двосторонньому транспортуванню білків і метаболітів.

Стромули, високо динамічні пластидні структури, можуть надавати конкретну перевагу для рослин, які знаходяться в несприятливих для розвитку кліматичних умовах, очевидно, тому, що вони полегшують обмін метаболітів, взаємодію між самими хлоропластами та іншими органелами. Отже, пластиди здатні змінювати об'єм поверхні і строми відповідно до фізіологічних вимог або програм розвитку, індукованих абіотичними факторами.

Дійсно, пропонувалася роль стромул в переміщенні монотерпеноїда гераніола [98], локалізації геранілгеранілдіфосфатсинтази, і в перерозподілі нуклеотидо-рецепторно-взаємодіючого протеїна 1 від ядра до пластиди під час реакції на патоген (nucleotide-receptor-interacting protein 1, NRIP1; [93, 99]. Деякі автори розглядають стромули як окремі домени пластиди, посилаючись на результати спостережень, в яких конкретний білок локалізувався у

струмулах, не зважаючи на те, що розглянутий білок локалізується в стромі і завдяки цьому рівномірно розподіляється по всьому тілу пластиди та у струмулах [100–103]. Зокрема, ці дослідження не дають жодного пояснення, в чому вони бачать різницю між суцільною пластидною стромою і заповненими стромою трубочками. Аналіз літературних джерел показав, що досі не отримано ультраструктурних або біохімічних доказів, які б дозволили вважати струмулу підструктурною складовою пластиди.

Для більшості альпійських і полярних рослин, які розвиваються в суворих кліматичних умовах і мають обмежений час вегетації, характерною є здатність використання цих властивостей для підвищення енергетичного метаболізму [104]. У більшості трав'янистих альпійських і полярних рослин струмули можуть виникати і під час фотосинтетичної активності [105–107]. Список понад 30 таких видів рослин, досліджених методом ТЕМ на наявність струмул, наведено в статті Луца [108]. Кілька біохімічних і фізіологічних механізмів у цих рослинах визначають їх стійкість до замерзання протягом вегетаційного періоду. Такі механізми вивчені у *D. antarctica* і недостатньо досліджені у *S. quitensis*. Серед них у *D. antarctica* виявлено високий відсоток насичених жирних кислот у клітинних мембранах листків [109], високу активність антифризових білків в апопласті [110] та інших індукованих несприятливими умовами білків, зокрема, дегідринів [111], а також високу концентрацію різних неструктурних вуглеводів [112–114].

Протягом дня, коли рослини активно отримують світлову енергію, низькі температури можуть значно впливати на показники енергетичного балансу, зокрема, при потужному потоку фотонів поглинута енергія може виявитись надмірною для використання і сприятиме виникненню фотоокислювального стресу [115]. Лучіні зі співавторами [116] повідомляли про середньодобове опромінення, яке досягало  $27,4 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$  у грудні в Антарктиці, що вказує на найвищий рівень опромінення у світі. Таким чином, антарктичним рослинам, зазвичай, необхідно долати вплив одночасно високої освітленості і низької температури, тому припускається, що у них існують відповідні механізми

адаптації. Аналіз результатів досліджень показав, що поки ще не отримано даних, які б оцінювали потенціал цих рослин щодо їх стійкості до фотоінгібування у польових умовах. При цьому, вже встановлено, що антарктичні види рослин мають високу стійкість до фотоінгібування в лабораторних умовах [117–120].

У двох раніше зазначених видів полярних рослин було виявлено дещо різні фотозахисні стратегії. Зокрема, *C. quitens* здатний регулювати електронний транспортний шлях, що дозволяє уникнути зменшення кисню, а *D. antarctica* активно використовує  $O_2$  як альтернативу електронам для захисту ФСII від надмірного світла [117, 121]. Крім цього, *C. quitens* має нижчі рівні антиоксидантних ферментів порівняно з *D. antarctica*, що свідчить про низький внесок циклу вода – вода до модуляції окисно-відновного стану фотосинтетичного електронного транспортного ланцюгу [122].

Обидві антарктичні рослини підвищують NPQ зі збільшенням інтенсивності світла при низькій температурі (4 °C). Проте, тільки рослини *C. quitens* виявили значне збільшення ємності тепловиділення (максимальне NPQ) при низьких температурах [117]. Зокрема, дисипація тепла у *C. quitens* в основному обумовлена динамічними і оборотними процесами (тобто, ксантофільним циклом), що вказує на адаптивність цього виду до мінливого світлового і температурного середовища [118].

Зважаючи на те, що зазначені два види рослин мають позитивні показники фотосинтезу при 0 °C, вважається, що ключові ферменти циклу Кальвіна залишаються активними при низькій температурі [123, 124] і припускається, що  $CO_2$  залишається основним стоком електронів [125]. Фотохімічне гасіння ( $qP$ ) у цих видів рослин збільшувалося з температурою та зменшувалося при оптимальних температурах. Таке зниження найвиразніше корелювало зі збільшенням  $qN$  у *C. quitensis* [125].

Ряд досліджень показав, що вплив низьких температур (холодова акліматизація) є основним фактором індукування деяких механізмів фотозахисту [118, 120, 122, 124]. Холодова акліматизація також сприяє



відновленню фотоінгібування, ймовірно, завдяки механізмам відновлення структури фотосинтетичного апарату [120].

#### **1.4. Основні шляхи адаптації рослин до низьких температур**

Протягом тривалої еволюції у рослин сформувались адаптаційні механізми, які надають їм можливість витримувати тривалий вплив низьких температур. Це зокрема, запасання речовин в корневих потовщеннях та цибулинах, скидання листків і уповільнення метаболізму, звуження водотransпортних шляхів для запобігання утворенню повітряних пухирців (емболія), які можуть виникати внаслідок замерзання і відтаювання води, а також інші адаптації [126].

Абіотичні стреси є основними екологічними викликами для росту та розвитку рослин, а також їх продуктивності. Одним з визначальних факторів навколишнього середовища вважається температурний режим, особливо його екстремальні значення – низькі та високі температури. Щоб впоратися з дією, наприклад, низьких температур, рослинами були розроблені різноманітні стратегії адаптації, серед яких відзначають механізми виділення теплової енергії, використання альтернативного (ціанід резистентного) дихання, накопичення осмопротекторів, а також експресію генів, направлену на синтез білків, які беруть участь у захисті клітинних компонентів від згубного впливу холоду. В цьому розділі обговорюються різні аспекти адаптації рослин до холодного стресу.

##### **1.4.1. Виділення теплової енергії**

Термогенез – це здатність живих організмів виробляти тепло в ході життєдіяльності, що дозволяє їм підтримувати вищу температуру, ніж в оточуючому середовищі. Здібність регулювати температуру свого тіла притаманна гомойотермним (теплокровним) птахам, ссавцям і багатьом групам літаючих комах. Саме висока і стабільна температура тіла дозволяє їм бути активними за умов низьких температур. На відміну від пойкилотермних

(холоднокровних) теплокровні види можуть ефективніше конкурувати за їжу і ареали, швидше розмножуватися, що за багатьох обставин є еволюційно більш вигідним [127].

Рослини, в переважній більшості, є пойкилотермними організмами, оскільки вони не здатні контролювати власну температуру, виробляючи тепло, і, щоб уникнути таких несприятливих впливів навколишнього середовища, як низька температура, у деяких стійких до холоду рослин часто формується ряд фізіологічних і метаболічних реакцій, які призводять до холодової акліматизації [128]. Проте існує одна група рослин, що була названа “термогенні рослини”, яка в ході еволюції розвинула здатність активувати певні метаболічні шляхи для підвищення температури конкретного органу або тканини.

Розігрів аруму європейського під час квітіння вперше був описаний французьким біологом Жан-Батістом де Ламарком ще у 1778 році [129]. З того часу значний розігрів квіток або суцвіть був задокументований у представників декількох родин рослин, які здебільш є примітивними насінневими рослинами з досить великими м'ясистими квітковими структурами. Запилення у цих рослин відбувається за участю жуків, бджіл або мух. Розмір рослини є важливою ознакою термогенних видів, оскільки рослини малих розмірів не здатні виробити достатню кількість тепла. Відомо, що 12 родин рослин проявляють квітковий термогенез, включаючи *Cycadaceae*, *Cyclanthaceae*, *Araceae*, *Annonaceae*, *Arecaceae*, *Aristolochiaceae*, *Nymphaeaceae* [130, 131], *Magnoliaceae* [132], *Illiciaceae* (тепер включено до *Schisandraceae* [133]; *Rafflesiaceae*, *Schisandraceae* [134, 135] та *Hydnoraceae* [136]. Квітковий термогенез і його зв'язок з покритонасінними було вперше відзначено Дієрінгером і співав. [132] та більш детально вивчено Азумою і співав. [137], Цієном і співав. [135] і Ендресом [138]. Квітковий термогенез є притаманним таксонам покритонасінних з протогінним типом запилення великих квіток, яке відбувається за допомогою комах, що також є характерним для родини *Nelumbonaceae* [135].

Серед термогенних рослин були ідентифіковані два типи термогенезу. У деяких видів протягом усього періоду запилення підтримується постійна температура квітки в межах певного діапазону, незалежно від умов навколишнього середовища. До цього типу відносяться такі термогенні види, як *Philodendron selloum* [139], *Nelumbo nucifera* [140] та *Symplocarpus foetidus* [141]. В рослинах інших термогенних видів виділення теплової енергії, як правило, відповідає періоду, коли жіночі органи квітки найбільш сприйнятливі до запилення і коли квіткові аромати бувають найсильнішими (при сонячному освітленні), наприклад, у *Dracunculus vulgaris*, *Helicodiceros muscivorus* [139, 142], а також у видів магнолії [143]. Такі термогенні рослини іноді називають псевдо-терморегулюючими видами.

Цікаві дані були отримані при дослідженні теплопродукції і теплорегуляції ароїдної лілії *Symplocarpus foetidus*, що росте в Північній Америці. Було показано, що температура тканин початку може досягати 20 °C при зовнішній температурі -14 °C [144]. Є кілька передумов того, що теплопродукція у *S. foetidus* безпосередньо не пов'язана із запиленням. Ця рослина відрізняється здатністю починати квітнути ранньою весною при температурах, близьких до 0 °C. При цьому нерідко квітки з'являються під сніговим покривом, і початок починає виділяти таку кількість тепла, яка є достатньою для танення снігу. Автор припускає, що термогенез у цьому випадку може служити захисним механізмом від шкідливого впливу низьких температур [144, 145]. Показано, що суцвіття *S. foetidus* здатні витримувати негативні температури, залишаючись на кілька градусів тепліше повітря. Термогенез у *S. foetidus* спостерігався на всіх фазах розвитку квітки, тоді як у більшості інших видів теплопродукція була чітко пов'язана зі стадією дозрівання жіночої квітки і знижувалась після запилення [145].

Крім цього, було отримано несподівані дані, що деякі види термогенних рослин здатні не тільки до теплопродукції, але також і до терморегуляції, що повністю підриває загальноприйняту точку зору про абсолютну пойкилотермію рослин. Таку особливість мають члени двох родів, які можуть

регулювати температуру своїх квіток, а саме, *Philodendron* (Araceae) та *Nelumbo* (Nelumbonaceae) [131, 146]. Встановлено, що температура їх квіток до деякої міри не залежить від мінливості температури навколишнього середовища. При зниженні температури повітря температура тканин квітки залишається постійною, при цьому збільшується швидкість споживання кисню і зростає різниця між температурами тканин квітки і зовнішнього середовища [139].

Було встановлено, що квітки *S. foetidus* можуть регулювати свою температуру: зниження температури повітря викликає збільшення швидкості поглинання кисню і рівня теплопродукції, що забезпечує підтримку постійної температури тканин [145]. Подібний ефект був відзначений також і у декількох інших видів термогенних рослин [139, 142]. При вивченні особливостей терморегуляції у *S. foetidus* в природних умовах було показано, що в інтервалі зовнішніх температур 3-24 °C, температура початку змінювалася від 16 до 26 °C, при цьому відмічався ріст теплопродукції, саме коли температура навколишнього середовища падала. Однак, коли зовнішня температура опускалася нижче 3 °C, температура початку і швидкість дихання також зменшувалися. Зі зниженням теплопродукції температура тканин квітки швидко зменшувалася практично до 0 °C. При підвищенні зовнішньої температури рослина могла відновлювати високий рівень теплопродукції, який досягав максимуму при температурі початку 16 °C. При більш високих значеннях цієї граничної величини була помічена зворотна залежність між швидкістю поглинання кисню і температурою тканин: збільшення температури тканин вище 16 °C призводило до зниження термогенезу [147].

Відзначається, що терморегулюючі рослини мають спільну рису, яка полягає в пролонгованій реакції рослин на зміни зовнішньої температури. Наприклад, було встановлено, що в разі, коли квітка *S. foetidus* опинялася під шаром снігу, що випав, її початок спершу охолоджувався, але через деякий час теплопродукція в ньому підвищувалася, і його температура починала підніматися [144]. У відповідь на вечірнє зниження температури повітря

*N. nucifera* (Nelumbonaceae) потрібно 2-3 години для посилення теплопродукції і приблизно такий же час для зниження інтенсивності термогенезу вранці [148].

У більшості термогенних видів, вивчених до теперішнього часу, субстратом для дихання є вуглеводи, які надходять у квітки з інших частин рослин, проте в *P. selloum* таким субстратом є ліпід, який зберігається в маленьких квітках до квітіння [149]. Прямий калориметричний і респірометричний аналізи продукування тепла показали, що енергія субстратів в *P. selloum* [150] і в *N. nucifera* [151] повністю вивільняється у вигляді тепла, хоча існує ймовірність, що незначна частина цієї енергії використовується для синтезу компонентів структури квіток.

У термогенних рослин визначено, що популяційна щільність мітохондрій на жіночій стадії розвитку початку була у два рази вище, ніж на чоловічій [152]. Крім того, електронно-мікроскопічні дослідження вказують на те, що тичинки на термогенній жіночій стадії, особливо мікроспори і плазмодії, мають високу щільність мітохондрій. Також показано, що маточки і пелюстки з початків на жіночій стадії містять більшу кількість мітохондрій, ніж на чоловічій. Отримані результати свідчать про те, що рослини могли б виробити значну кількість тепла в їх тканинах за рахунок збільшення кількості мітохондрій.

Було показано, що електронна щільність мітохондрій суцвіть термогенного виду *S. guttatum* також змінювалася в процесі розвитку. За 2-3 дні до початку виробництва теплової енергії мітохондрії накопичували осміофільний, електронно-щільний матеріал між внутрішньою і зовнішньою мембранами. У процесі термогенезу і виділення летючих з'єднань атрактантів осміофільний матеріал зникав з міжмембранного простору. Відкладення з такою ж електронною щільністю також спостерігалися в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) [153].

Отже, на клітинному рівні виявлено якісні та кількісні зміни, в першу чергу, в структурі мітохондрій термогенних органів, а також у вакуолях та в ендоплазматичному ретикулумі. Ці дані свідчать про те, що рослини можуть

виробляти значну кількість тепла в їх термогенних тканинах за рахунок збільшення популяції мітохондрій та активації в них термогенних систем.

#### **1.4.2. Ціанід-резистентне дихання**

У мітохондріях живої клітини тепло може утворюватися при гідролізі АТФ, а також при розсіюванні  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  (роз'єднане дихання) і при окисленні субстратів системами, що не утворюють ні АТФ, а ні  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ . Два останні процеси В.П. Скулачов пропонує об'єднати під назвою «вільне окислення» [154, 155]. Термогенез за рахунок вільного окислення за низьких температур продемонстровано на тканинах тваринного [154], а також рослинного походження [156]. Існує ряд речовин, які здатні роз'єднувати окиснення і фосфорилування. Показано, що при додаванні роз'єднувальних агентів до мітохондрій припиняється або зменшується синтез АТФ [157]. При цьому швидкість транспорту електронів залишається високою, проте не створюється протонний градієнт; таким чином енергія реакції перенесення електронів перетворюється на тепло.

Ендотермічні тварини виробляють тепло, «спалюючи» жири та цукор при диханні. На противагу цьому показники дихання у більшості рослин занадто малі, щоб виробляти достатню кількість тепла для нагріву їх тканин. Проте рослини мають, принаймні, два механізми, за допомогою яких мітохондріальний транспорт електронів може від'єднуватися від синтезу АТФ, що дозволяє рослинному організму використовувати енергію для вироблення тепла.

Перший з них включає в себе функціонування альтернативної оксидази, або ціанід-резистентний шлях дихання, який виявлено у всіх рослин, а також у грибів, прокариот і у тварин з багатьох таксонів [158, 159]. Другий механізм передбачає участь білків-роз'єднувачів, які, як відомо, присутні у багатьох еукаріотів [160]. У мітохондрій термогенних рослин в нормі дихання пов'язане з фосфорилуванням і чутливе до ціаніду і антимицину А. При квітненні в

тканинах більшості термогенних рослин дихання від'єднується від фосфорилування і стає ціанід-резистентним [161].

Мітохондрії всіх досі вивчених рослин, більшості грибів, водоростей і деяких найпростіших, на додаток до канонічної цитохромоксидази основного дихального ланцюга, що інгібується ціанідом, містять нечутливу до дії ціаніду термінальну оксидазу, названу альтернативною оксидазою (АО) [159].

Альтернативна оксидаза (АО) безпосередньо асоційована з окисненням убіхінону з відновленням  $O_2$  до  $H_2O$ . АО представляє таку гілку в ЕТЛ, що електрони в убіхіноні розділяються між цитохромоксидазним шляхом і АО (рис. 1.10). Примітно, що АО різко знижує вихід енергії дихання (АТФ), оскільки він не накачує протонами, а електрони, що потрапляють до АО, обходять протонні насосні комплекси III і IV [162].

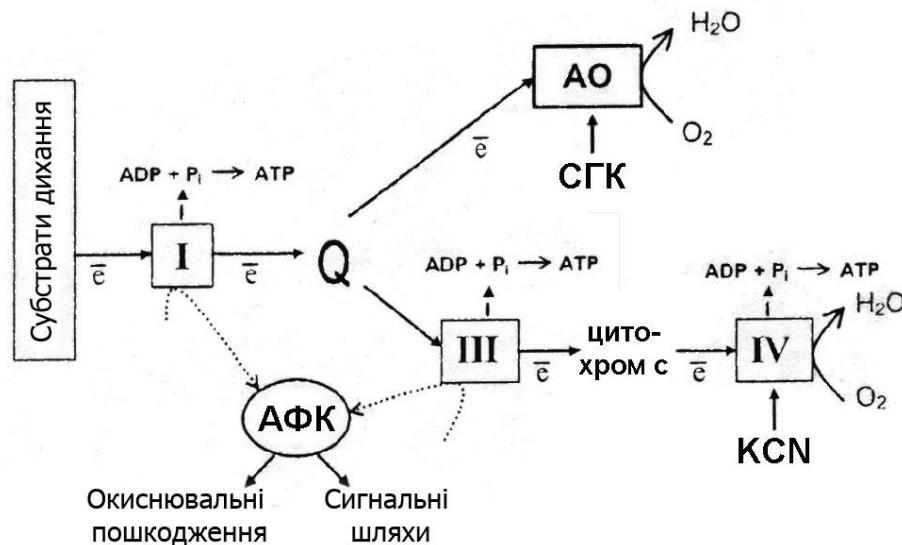


Рис. 1.10. Схема електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій рослин (за Робсон і Ванлерберг) [162]. I, III, IV – комплекси ЕТЛ з ділянками спряження, АФК – активні форми кисню, СГК – саліцилгідроксимова кислота – інгібітор АО, Q – убіхіноновий пул.

Електронний потік до АО все ще може підтримувати знижений вихід АТФ, якщо ці електрони виникають через протон-накачувальний комплекс I. Однак, якщо потік електронів на АО підтримується альтернативними

дегідрогеназами або комплексом II (що, на відміну від комплексу I, не здійснює накачування протонів), то потік електронів буде повністю відключений від обороту АТФ. В цілому, рослини мають додаткові компоненти ЕТЛ, що дозволяють різко змінювати вихід АТФ в залежності від компонентів шляху, що використовується для окислення НАДФН та відновлення  $O_2$  [161].

Окислення НАДН комплексом I є спряженим з протонним транспортом з матриксу до внутрішнього міжмембранного простору, тоді як окислення НАДФН рядом альтернативних дегідрогеназ не пов'язане з протонним транспортом. Аналогічно потік електронів від убихінону до комплексу IV (відновлення  $O_2$  до  $H_2O$ ) пов'язаний з протонним транспортом (на двох ділянках), тоді як потік електронів від убихінону до АО (також відновлення  $O_2$  до  $H_2O$ ) не є пов'язаним з протонним транспортом. Протонний транспорт формує протонну рушійну силу, яка згодом розсіюється АТФ-синтазою (комплекс V), продукуючи АТФ. Рослини можуть модулювати вихід АТФ в залежності від компонентів використовуваного ЕТЛ для окислення НАДФН та відновлення  $O_2$ . Якщо здатність компонента ЕТЛ до транспорту електронів знижена і/або мембранний потенціал високий, електронний транспорт може уповільнюватися, що призводить до надмірного скорочення ЕТЛ. За цих умов перетікання електронів до  $O_2$  або нітриту збільшується, виробляючи  $O_2$  і NO, відповідно [163].

Відкриття альтернативної оксидази тісно пов'язано з феноменом теплопродукції у термогенних рослин. Дослідження структурних і генетичних характеристик альтернативної оксидази почалися з 1987 року, коли її білок був вперше виділений з мітохондрій *S. guttatum*. У цих експериментах було отримано моно- і поліклональні антитіла, які реагували на імуноблотах з трьома смугами білків з мол. масами 35, 36 і 37 кДа [164].

Виявлено, що активний центр альтернативної оксидази містить 2-валентне залізо. Дослідниками була запропонована модель структури альтернативної оксидази, згідно з якою білок АО занурено у внутрішню мембрану мітохондрій двома гідрофобними  $\alpha$ -спіральними ділянками, а на



поверхні з боку матрикса виступають N- і С-кінцеві ділянки [165, 166]. На відміну від грибів, у яких функціональною одиницею білку АО є мономер, рослинний фермент має димерну структуру і є малоактивним, якщо його субодиниці ковалентно пов'язані дисульфідними містками. При вивченні особливостей регуляції активності АО рослин було виявлено, що вона помітно збільшується в присутності  $\alpha$ -кетокислот, особливо пірувата, але тільки якщо фермент знаходиться у відновленому стані. На активність АО також впливають редокс-стан мітохондрій та рівень відновленого убіхінона [167]. Нуклеотиди (АМР) активують АО грибів, дріжджів і найпростіших, тоді як у рослин подібного ефекту не виявлено [168].

Активність АО рослин не інгібується не тільки ціанідом, а й азидом, СО, антиміцином А та міксотіазолом. Альтернативний шлях відгалужується від основного дихального ланцюга на рівні убіхінона і каталізує чотирьохелектронне окислення відновленого убіхінона (убіхінола) киснем до води незалежно від основного дихального ланцюга [169, 170]. Як уже зазначалося вище, перенесення електронів через АО не спряжене ані з синтезом АТФ, ні з запасанням енергії, і енергія окислення убіхінона киснем виділяється у вигляді тепла [171–173]. Активність АО залежить від природи субстрату, що окиснюється, загальної концентрації убіхінона і його редокс-стану в мембрані, а також від концентрації кисню в клітині [170]. Характерною особливістю альтернативного шляху є його ефективне інгібування ароматичними гідроксамовими кислотами з  $K_i = 1,5$  мМ (типовий представник – саліцилгідроксамова кислота). І хоча тепер з'ясувалося, що гідроксамові кислоти не є «інгібіторами одного ферменту», проте вони залишаються найбільш зручним і часто використовуваним інструментом при ідентифікації ціанідрезистентної оксидази. На сьогодні описано і деякі інші інгібітори АО: 2,5-дибромоз-метил-6-ізопропіл-п-бензохінон, дисульфірам, 5-децил-6-гідрокси-4,7-диоксобензотіазол, п-пропілгалат і різні гідроксоамінові кислоти [174], аскофуранон [175].

Дані про спорідненість АО до кисню в основному суперечливі. Вважається, що критична концентрація кисню для альтернативного шляху вище, хоча й не набагато, ніж для основного дихального ланцюга [172, 173]. Цікаво, що заміна Thr-179 або Cys-172 в АО, яку виділили з *S. guttatum*, приводила до двократного збільшення спорідненості ферменту до кисню [176].

В нормальних умовах (тобто за умов функціонування основного дихального ланцюга і за відсутності стресу) активність АО або досить низька, або зовсім не виявляється. Однак вона значно зростає при інгібуванні термінальної частини основного дихального ланцюга в результаті: а) вирощування організмів на середовищах з дефіцитом іонів заліза, сірки або міді; б) вирощування або інкубації клітин, що знаходяться в стані спокою, в присутності антимицину А, ціаніда або азида; в) вирощування або інкубації клітин, що знаходяться в стані спокою, в присутності інгібіторів мітохондріальної транскрипції і трансляції; г) мутаційних змін ядерного або мітохондріального геному; д) інгібування системи окиснювального фосфорилування; е) зниження концентрації кисню; є) інгібування реакцій циклу трикарбонових кислот [177]. Висновки про такого роду зміни зроблено на підставі збільшення кількості транскриптів або білка АО, а також активації ціанідрезистентного окиснювального шляху, чутливого до дії гідроксамової кислоти [178, 179].

Функціонування ціанід-резистентного дихання в мітохондріях може бути пов'язано і зі зміною фізіологічного стану тканини, органу або цілого організму. Класичний приклад – це багаторазове, лавиноподібне зростання активності АО в термогенних тканинах ароїдних рослин протягом декількох днів [180–182], при цьому АО залишається єдиною термінальною оксидазою і окиснення субстратів в дихальному ланцюзі супроводжується виділенням тепла, достатнього для формування летючих атрактантів, які приваблюють комах, що запилюють ці рослини.

Вважається, що альтернативний дихальний шлях може також підтримувати мітохондріальний транспорт електронів при низьких

температурах, що призводить до утворення токсичних активних форм кисню (АФК). Ця роль підтверджується спостереженням, що кількість білка альтернативної оксидази часто збільшується, коли рослини розвиваються за низьких температур [163, 183].

Альтернативна оксидаза у вищих рослин кодується мультиплетною родиною генів [184]. Наприклад, при дослідженні геному рослин *Arabidopsis thaliana* було відкрито як мінімум 4 копії гена альтернативної оксидази (*AOX1a*, *AOX1b*, *AOX1c* і *AOX2*), транскрипція яких, очевидно, має специфічну для тканин регуляцію [185]. Три гена альтернативної оксидази було виявлено у рисі (*AOX1a*, *AOX1b* і *AOX1c*) [181].

Встановлено, що саліцилова кислота (активатор експресії генів альтернативної оксидази) є одним з ендогенних сигналів для посилення активності альтернативного шляху дихання [186]. Рівень саліцилової кислоти значно збільшується в період квітіння у ароїдних рослин, що відповідно викликає підвищення вмісту білка альтернативної оксидази і збільшення теплопродукції [180]. Також показано, що саліцилова кислота збільшує швидкість ціанідрезистентного дихання у суспензійній культурі клітин тютюну [187].

Дискусійним залишається питання про фізіологічну роль ціанідрезистентної оксидази. Можливо, вона полягає в компенсації дихання за умов, коли основний шлях є повністю насиченим або заінгібованим [167, 168]. Інші дослідники вважають, що альтернативний шлях перенесення електронів є необхідним для підтримки пулу відновленого убіхінона на рівні, при якому не утворюються активні форми кисню, що згубно діють на клітину [167, 188]. Висуваються також гіпотези, згідно яких альтернативна оксидаза бере участь в процесах диференціювання тканин, захисті від фітопатогенів, дозріванні фруктів та ін. [168, 189].

Незважаючи на накопичені дані про біохімічні та генетичні характеристики альтернативної оксидази, досі немає чіткого уявлення про фізіологічну роль, яку виконує даний фермент. Ймовірно, функціонування

альтернативної оксидази є однією із системних реакцій рослинного організму на вплив стресового чинника, і її роль в метаболізмі багатозначна. З огляду на той факт, що не виявлено будь-яких структурних або регуляторних особливостей альтернативної оксидази у термогенних рослин у порівнянні з нетермогенними, можна припустити, що відмінності між цими рослинами можуть бути не стільки якісними, скільки кількісними. Так, в дослідженнях, проведених у лабораторіях Раскіна [183, 190, 191] та Войнікова [192–194], було висунуто припущення, що альтернативна оксидаза може виконувати терморегуляторну функцію при низькотемпературному стресі у нетермогенних рослин.

Таким чином, альтернативна оксидаза є енергетично-дисипативним ферментом, оскільки вона не сприяє формуванню протонного електрохімічного градієнта через внутрішню мембрану і, як наслідок, синтезу АТФ. Вважається, що різкий стрибок вільної енергії в результаті реакції, яку каталізує альтернативна оксидаза, в термогенній рослині супроводжується вивільненням тепла. Дійсно, велика ємність ціанід-резистентного дихання асоціюється з термогенезом у рослин, незалежно від того, чи є він тимчасовим або гомотермічним.

Встановлено, що ціанідрезистентне дихання, або альтернативне по відношенню до основного цитохромного, за своєю природою є нефосфорилуючим, тобто неспряженим з синтезом АТФ, тому потенційна енергія хімічних зв'язків окиснених субстратів перетворюється в тепло.

### **1.4.3. Застосування кріопротекторів**

Низькі і високі температури, посуха та засолення можуть зумовлювати появу у рослин осмотичного стресу. У деяких рослин розвинулася висока здатність до синтезу і накопичення осмопротекторів, або сумісних розчинних речовин, які забезпечують стійкість до впливу цих абіотичних факторів. Будучи нетоксичними, осмопротектори накопичуються до осмотично значущих рівнів без порушення метаболізму рослин. Вони поділяються на кілька груп:

амінокислоти (наприклад, пролін), сполуки четвертинного амонію (гліцинбетаїн), поліаміни (путресцин, спермін та спермідин) і цукри (сахароза, трегалоза, фруктан).

Пролін, накопичення якого у відповідь на стрес є широко відомою реакцією різних рослин на дію факторів навколишнього середовища, зокрема і холоду [195], захищає рослини від осмотичного та оксидативного стресів і окислення білків [196–198], а також діє як антиоксидант, хелатор металу і сигнальна молекула [198]. У рослин трансгенного рису, які надмірно експресують OsCysB1;1, виявили стійкість до холодowego стресу за рахунок збільшення вмісту вільного проліну в їх клітинах порівняно з рослинами дикого типу [199].

Гліцинбетаїн (ГБ) є важливим осмолітом, який накопичується в більшості рослин при дії різних екологічних чинників, включаючи холодний стрес [200–204].

Поліаміни (ПА), зокрема спермін (Спм), путресцин (Пут), і спермідин (Спд) є універсальними полікатіонними (позитивно зарядженими) органічними сполуками, які мають дві або більше первинних аміногруп.). Як правило, високий вміст ПА спостерігається у рослин при холодovому стресі або акліматизації до холоду [205, 206]. Наприклад, у арабідопсиса при холодovому стресі відбувалося значне збільшення накопичення ПА, особливо Пут, яке відбувалося за рахунок регулювання транскрипції генів *ADC1* і *ADC2*; мутанти, дефіцитні по *adc1* і *adc2*, проявляли більш низьку стійкість до охолодження, ніж рослини дикого типу [207]. У рослин стевії під впливом синтетичних поліамінів при холодovому стресі вміст АФК був більш стабільним в порівнянні з контролем [208].

Одним із механізмів адаптації рослин до холодovого стресу є накопичення сумісних осмолітів, серед яких особлива роль належить цукрам. Ендогенні цукри є найважливішими регуляторами, які полегшують багато фізіологічних процесів, таких як фотосинтез, проростання насіння, квітнення, старіння, а також при різних абіотичних стресах.

Дослідження показали, що існує пряма кореляція між викликанною холодом модуляцією метаболізму сахарози і стійкістю до низької температури [209–211]. Високий вміст розчинних цукрів, включаючи сахарозу, стахіозу, сорбіт, глюкозу, рафінозу, фруктозу і манітол, виявлено у зимуючих або акліматизованих до холоду рослин [209, 212]. Накопичення розчинних цукрів також протидіє замерзанню, крім допомоги рослинам в осморегуляції за умов стресу [213]. Підвищений вміст розчинних цукрів спостерігався під час холодової акліматизації у *A. thaliana* [214, 215], озимої пшениці [216], *Alcantarea imperialis* [209], ячменя [217], картоплі [210], рису [218] і капусти [219]. Зміни в розподілі різних цукрів можуть захищати конкретні компартменти, регулюючи розтягування клітин і дегідратацію [220]. Отримано підтвердження, що цукор накопичується у хлоропластах капусти при холодovому стресі [221].

Цукри активно залучаються рослинами під час холодovого стресу і є життєво важливим при передачі сигналів і надекспресії регульованих холодом генів [222]. Надмірне накопичення декількох молекулярних форм ферменту трегалозо-6-фосфатсинтази підвищувало в рослинах рису стійкість до абіотичних стресів, включаючи холод [223]. Рослини зі зміненим метаболізмом цукру розширюють наше уявлення про роль цукрів у холодостійкості. Наприклад, інтрогресія гену фруктозил-трансферази у фруктан-дефіцитні рослини рису і рослини тютюну посилює не тільки синтез фруктану, але також і його стійкість до холодovого стресу [224]. Альфа-галактозидаза ( $\alpha$ -Гал) регулює різні рослинні процеси, такі як гідроліз  $\alpha$ -1,6-зв'язку рафінози в момент деакліматизації. В експериментах на фоні збільшення вмісту рафінози, зниження  $\alpha$ -Гал зумовлювало появу або підвищення холодостійкості як у пристосованих до холоду рослин петунії, так і у неакліматизованих рослин [225].

Попередню обробку сахарозою і холодом перед кріоконсервацією часто використовують для поліпшення її результатів [210]. Абіотичні стреси викликають серію реакцій рослин, тим самим готуючи рослинний матеріал для

подальшої кріоконсервації. Сприйняття стресу призводить до активації сигнальних шляхів і зміни експресії генів, відповідно змінюючи фізіологію рослин, їх ріст і розвиток [222]. Серед механізмів мінімізації шкідливих ефектів, викликаних абіотичними стресами, увагу привертає синтез осмолітів, деякі з них відомі як кріопротектори. Результати експериментів показали, що попередня обробка сахарозою пов'язана з підвищенням стійкості до кріоконсервації і здатності рослин до акліматизації за низьких температур [210].

Сучасні підходи доцільно використовувати для вивчення ролі цукрів у здійсненні життєво важливих фізіологічних процесів у рослинах, таких як поділ клітин, клітинний цикл, сигналінг, гормональна регуляція і запрограмована клітинна смерть, за умов дії гіпотермії. Необхідні широкі молекулярні, фізіологічні та цитологічні дослідження для пізнання сигналінгу цукрів в опосередкуванні процесів, починаючи з ембріогенезу і закінчуючи старінням. Сигналінг цукрів останнім часом є в центрі уваги інтенсивних наукових досліджень. Залишається нез'ясованою взаємодія цукрів, фітогормонів і структурних змін клітинних органел в енергетичних комплексах, їх роль в багатьох процесах, зокрема, диханні, фотосинтезі, метаболізмі вуглецю та азоту, ростових реакціях і розвитку рослин.

Отже, вище викладені дані щодо будови та функціонування енергетичних органел переконливо свідчать про їх надзвичайно важливу роль в існуванні та розвитку рослин, їх реакціях на зовнішні умови. Формування стійкості рослин до абіотичних факторів відбувається на клітинному, субклітинному та молекулярному рівнях їх організації. На субклітинному рівні проявляється динамізм хлоропластів та мітохондрій, який дозволяє забезпечити їх безперебійне функціонування та збереження за умов змін стадій розвитку та навколишнього середовища, зокрема, температурного режиму. Водночас зовсім або недостатньо з'ясованими залишаються перебудови ФСА і мітохондрій та їх функціонування у ефемероїдних видів рослин на різних етапах росту листків за низьких температур. Немає чіткої відповіді на питання щодо участі сахарози в

реакціях фотосинтетичного апарату на вплив низьких температур. На з'ясування цих питань і були спрямовані експериментальні дослідження, результати яких викладено у наступних розділах.

Аналіз літературних даних стосовно термогенезу і ролі ціанід-резистентного дихання в адаптаціях рослин до низьких температур опублікований у вигляді оглядової статті: Білявська НО, Подорванов ВВ, Федюк ОМ (2016) Сучасні уявлення про термогенез у рослин та його механізми. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(38): 28-45.



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Характеристика рослинного матеріалу

У дослідженні використовувались цибулинні багаторічні рослини виду підсніжник білосніжний *Galanthus nivalis* L. (рис. 2.1), які характеризуються коротким весняним періодом розвитку і цінними лікарськими властивостями [226]. Для виявлення структурних особливостей листків з рослин відбирали листки після появи їх на поверхні ґрунту, а також на вегетативному і генеративному (бутонізації і квітненні) етапах розвитку рослин. Вибір об'єкту дослідження був обумовлений здатністю фотосинтетичного апарату листків *G. nivalis* формуватись і функціонувати протягом весни за низьких температур.

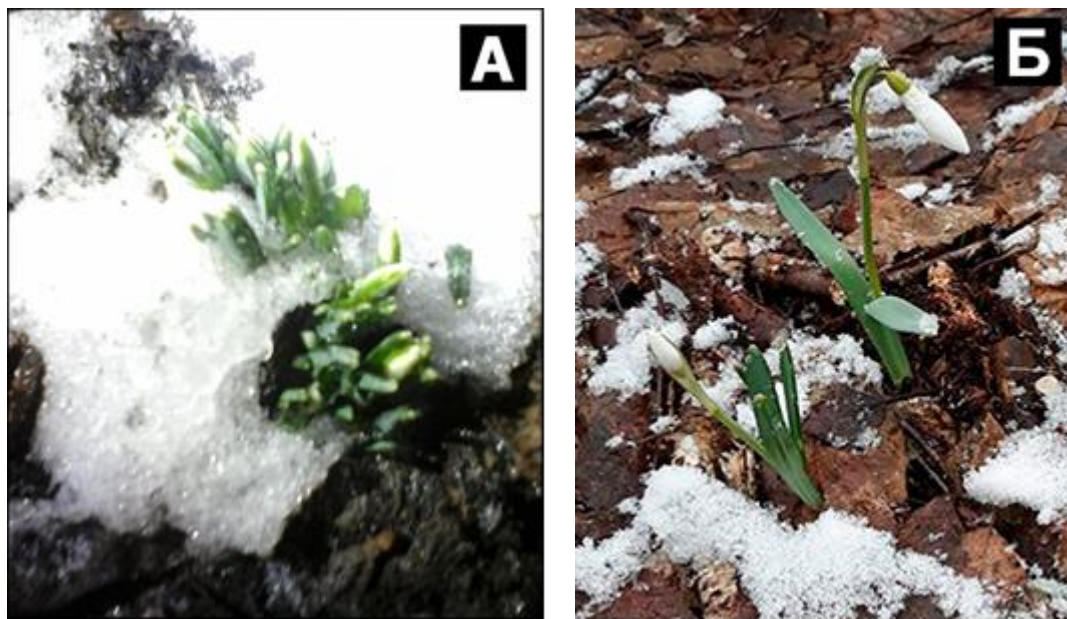


Рис. 2.1. Підсніжник білосніжний *G. nivalis* на весняних етапах появи листків з ґрунту (А) та бутонізації (Б) в природних умовах.

Підсніжник білосніжний *Galanthus nivalis* L. належить до роду Підсніжник (*Galanthus* L.), родини Амарилісові (*Amaryllidaceae* Jaume St-Hil.), підпорядку *Alliineae* Link., порядку Холодкоцвітні (*Asparagales* Link.), підкласу Ліліїди (*Liliidae*), класу Однодольні (*Liliopsida*), відділу Покритонасінні

(*Magnoliophyta*) [227]. Це багаторічна трав'яна рослина заввишки 8-20 см [228] із підземною цибулиною, обгорнутою трьома бурими шкірястими лусками. Прикореневі два листки шириною 4-6 мм, лінійні, сірувато-зелені, виходять із піхвових лусок [226]. Стебло прямостояче. Квітки на пониклих квітконіжках, поодинокі виходять із піхов приквітка. Зовнішніх листочків оцвітини три, вони білі, видовжені; внутрішні три листки вдвічі коротші, дзвоникоподібні, прямі, із зеленкуватою крапкою на кінці. Плід тригніздна коробочка. Цвіте в березні–квітні, плодоносить в травні–червні. Розмножується цибулинами та насінням. На території України поширений у листяних, переважно дубових та дубово-грабових лісах, на галявинах, узліссях, чагарниках, де переважають багаті поживними речовинами, достатньо зволожені ґрунти [229]. В онтогенезі *G. nivalis* характерною особливістю є закладання майбутньої квітки, переважно, наприкінці четвертого року [226], тому для охоплення всіх етапів розвитку, в тому числі бутонізації і квітнення, в експериментах використовувались рослини п'ятого року розвитку, у яких передбачалась поява квітки і плодоношення навесні того ж року.

Підсніжник білосніжний (*G. nivalis*) – рослина, що містить ряд корисних біологічно активних сполук. Специфічні алкалоїди, що синтезуються цими рослинами, привернули значну увагу через їх важливу фармакологічну активність [230]. Серед цих алкалоїдів, галантамін, є довготривалим, селективним і конкурентним інгібітором ферменту ацетилхолінестерази, який використовується в медицині для полегшення травматичних ушкоджень нервової системи при лікуванні хвороби Альцгеймера, поліомієліту, деменції та інших неврологічних захворювань [231, 232]. Алкалоїд аглютинін *G. nivalis* (GNA), що належить до родини лектинів, суперродини тісно зв'язаних з маннозою специфічних лектинів, як відомо, володіє широким спектром біологічних функцій, зокрема, протипухлинною, антивірусною та протигрибковою [233]. Цей лектин демонструє значну активність проти вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) [234]. GNA також є ефективним інсектицидом проти різноманітних комах-шкідників, що належать до порядків *Homoptera*,

*Coleoptera* і *Lepidoptera*, та практично не впливає на інших комах і ґрунтових бактерій [235]. Рослини *G. nivalis* використовуються як джерела гідроксицинамової та інших органічних кислот, що мають сильні антирадикальні та антиоксидантні властивості; вони також проявляють протизапальну, противірусну та імуностимулюючу активність [236].

У наших дослідженнях використовувались листки рослин *G. nivalis*, які розвивались в природних умовах у відкритому ґрунті на ділянках Моквинського лісництва Костопільського району Рівненської області. Кліматичні умови в межах лісництва характеризуються переважанням середніх температур повітря у січні  $-4,8$  °С, у травні  $+18,1$  °С (за період з 2012 по 2017 роки) [237]. Рельєф місцевості, переважно, рівнинний, без значних пагорбів та западин. Поверхневий шар ґрунту з переважанням опідзолених (сірих-лісових, темно-сірих). В межах зазначеного лісництва, етап появи листків *G. nivalis* з ґрунту розпочинався в середині лютого (рис. 2.2 А), коли поверхня ґрунту була, переважно, вкрита сніговим покривом, а надземний розвиток завершувався в кінці травня.



Рис. 2.2. Вигляд ділянок поширення *G. nivalis* на етапах появи листків з ґрунту у лютому (А) та квітненні у березні (Б).

Структурні зміни поверхні листків, прорихів, мітохондрій і хлоропластів за низьких температур в природних умовах під час появи листків з ґрунту, а також на етапах бутонізації, квітнення, виявляли з вимірюванням температури

листіків, атмосферного повітря і ґрунту, вологості ґрунту без вилучення рослин з ґрунту. Після цього листки зрізали, фіксували і готували до трансмісійної електронної мікроскопії для отримання ультраструктурних фотографічних зображень з метою їх порівняння.

Зміни інтенсивності клітинного дихання та функціональних показників фотосинтетичного апарату листків *G. nivalis* на вище згаданих етапах розвитку, виявляли з відбиранням рослин п'ятого року вегетативного розвитку, у яких передбачалась поява квітки. Вилучені з ґрунту рослини висаджували на ділянки Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України у відкритий ґрунт, де вони перебували до часу проведення експериментів.

## **2.2. Загартування рослин і обробка сахарозою**

Вплив екзогенної сахарози на структуру хлоропластів і функціональні показники фотосинтетичного апарату листків *G. nivalis*, вивчали на листках рослин, які в лабораторних умовах загартувувались і оброблялись сахарозою різної концентрації.

Загартування рослин здійснювали в такій послідовності. На початковому етапі цибулини *G. nivalis* висаджували в спеціальні горщики, заповнені ґрунтовим субстратом, у якому вміст азоту становив 120 мг / л, фосфору – 160 мг / л, калію – 190 мг / л, рН 5,5-5,8. Температура атмосферного повітря підтримувалась в межах плюсових значень 22-23 °С, а відносна вологість ґрунту досягала 80-85%. Після 17 діб перебування цибулин в темряві і появи листків на поверхні ґрунту, рослини переводили на 8/16-год (світло / темрява) добового циклу за інтенсивності освітлення ( $180 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ). Загартування здійснювали до початку експерименту експозицією рослин за низьких плюсових температур (+5 °С вдень і +3 °С вночі) протягом 14 діб з 8-годинним фотоперіодом при штучному освітленні (за щільності потоку фотонів  $80 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) для запобігання фотоінгібуванню.

На початку експерименту при +5 °С листки зрізали з рослин і розміщували на вологий фільтрувальний папір в чашках Петрі. До контрольної

групи листків в чашки Петрі вносили дистильовану воду, а до двох експериментальних груп листків додавали відповідно 0,02 М або 0,1 М розчини сахарози. Обробка сахарозою тривала протягом однієї години. Далі контрольні і експериментальні листки поступово охолоджували до досягнення температури  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  або  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Потім контрольні і експериментальні листки готували для трансмісійної електронної мікроскопії та вимірювання флуоресценції хлорофілу.

### **2.3. Трансмісійна електронна мікроскопія**

Для трансмісійної електронної мікроскопії з середньої частини листків вирізали фрагменти листкових пластинок довжиною 2-3 мм, шириною 1 мм. Зразки фіксували у 2,5% розчині глутарового альдегіду (ГА) на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2) за температури 18-22  $^{\circ}\text{C}$ . Потім у свіжому розчині цього фіксатора дослідний матеріал тримали добу в холодильнику за температури 4  $^{\circ}\text{C}$ , після чого матеріал тричі промивали розчином 0,1 М какодилатного буферу. Для подальшої постфіксації використовували розчин 1%  $\text{OsO}_4$  на 0,1 М какодилатному буфері (рН 7,2), в якому залишали матеріал на 12-14 год при 4  $^{\circ}\text{C}$ . Після цього матеріал ополіскували дистильованою водою та зневоднювали, послідовно обробляючи розчинами етанолу висхідної концентрації (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%), при цьому 70% етанол був насичений 2% уранліацетатом. Остаточне зневоднення матеріалу здійснювали тричі 100% етанолом з додаванням на кінцевому етапі пропіленоксиду. Після цього матеріал спочатку просочували сумішшю епоксидних смол з пропіленоксидом, а потім заливали епон-аралдитною смолою за стандартною методикою [238]. Полімеризацію смоли здійснювали в термостаті протягом 3 діб при температурі 37 і 60  $^{\circ}\text{C}$ . Ультратонкі зрізи листків, отримані із застосуванням ультрамікроскопа LKB-V (LKB, Швеція), розміщували на однощілинні бленди з формваровою плівкою з вугільним напиленням. Далі зрізи контрастували спочатку 1% розчином уранліацетату протягом 1 год у темряві, а потім розчином цитрату свинцю 3-5 хв. Підготовлені препарати

досліджували й фотографували на плівку типу EB19H (AGFA, Бельгія) у трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1300 (JEOL, Японія) за напруги 80 кВ. Фотографічні зображення ультраструктури клітин мезофілу рослин отримували при збільшенні в 10000, 15000 та 100000 разів.

Для створення цифрових зображень досліджуваних об'єктів негативи фотографій сканували на сканері Epson Perfection 3200 Photo. Подальше опрацювання растрових зображень клітин мезофілу здійснювали із застосуванням комп'ютерної програми Corel Photo Paint 11.

#### **2.4. Сканувальна електронна мікроскопія**

Метод сканувальної електронної мікроскопії застосовували для отримання фотографічних зображень структури поверхні листків і продихів *G. nivalis*. З середньої частини листової пластинки робили поздовжні висічки довжиною 6 мм і шириною 3 мм, які наклеювали на латунні предметні столики за допомогою двосторонньої клейкої стрічки. Для надання кондуктивності листові препарати покривали тонким шаром золота (10 нм) в іонному напилювачі і вивчали в сканувальному електронному мікроскопі JSM 6060 LA (JEOL, Японія).

#### **2.5. Світлова мікроскопія**

Зі зразків листків, фіксованих для електронно-мікроскопічних досліджень, виготовляли напівтонкі поперечні зрізи (0,5–1,0 мкм) на ультрамікротомі LKB-V (LKB, Швеція), які забарвлювали 0,5 % толуїдиновим синім на 1 % розчині бури. Дослідження проводили на мікроскопі Axioscope ("Carl Zeiss", Німеччина) з цифровою фотокамерою Canon PowerShot A 480.

#### **2.6. Морфометрія**

Протягом весняного періоду розвитку *G. nivalis*, зокрема, під час появи листків на поверхні ґрунту, вегетативного і генеративного етапів, для експериментів обсяг вибірки становив не менше 30 листків *G. nivalis*.

Їх морфометричні показники вимірювали на кожному етапі розвитку у 9-кратній повторності.

Ультраструктурні параметри мітохондрій і хлоропластів мезофілу листків на кожному етапі розвитку визначали за середніми значеннями їх лінійних розмірів та площі на створених оцифрованих фотографічних зображеннях із застосуванням засобів програми Micro-Manager 1.4 (National Institutes of Health, USA).

Кількість та розміри порохів на мікроструктурних препаратах вимірювали із застосуванням засобів ImageTool 3.0 (UTHSCSA, США) також у 9-кратній повторності.

## **2.7. Інфрачервона термографія**

Вимірювання і збереження в цифровому форматі значень показників температури (тобто енергії електромагнітних хвиль) атмосферного повітря, ґрунту і листків на різних етапах розвитку *G. nivalis*, здійснювали із застосуванням переносного пристрою “Fluke Ti 105” (Fluke Corporation, USA) [239] (рис. 2.3).

Інфрачервону камеру пристрою розміщували на відстані 30-50 см від поверхні ґрунту над досліджуваними рослинами. На отриманих таким чином оцифрованих фотографічних растрових і інфрачервоних зображеннях виділяли по тридцять пікселів в межах листкової поверхні і ґрунту. Цифрові температурні значення кожного пікселя інфрачервоного зображення зберігались автоматично пристроєм на MicroSD пам'яті і в подальшому у ручному режимі експортувались в програмне середовище Statistica 11.0, для автоматизації статистичного аналізу та графічної візуалізації результатів експериментів.

Разом з термографом “Fluke Ti 105” для синхронного автоматичного вимірювання і збереження у вказаний інтервал часу на MicroSD цифрових значень температури листків, атмосферного повітря і ґрунту, вологості ґрунту



на різних етапах розвитку рослин *G. nivalis* застосовували мультиметричний пристрій “DMLAS-1” [240] (Додаток Б).



Рис 2.3. Пристрій “Fluke Ti 105” в робочому режимі вимірювання температури листків і поверхні ґрунту ранньою весною.

Отримані приладами дані опрацьовувались з використанням методів математичного аналізу варіаційної статистики.

## 2.8. Полярографія

У день проведення експерименту з рослин *G. nivalis* зрізали листки і протягом 5 хв dopravляли їх у приміщення лабораторії. Інтенсивність поглинання листками кисню визначали із застосуванням полярографа, оснащеного електродом конструкції Кларка [241]. За 30 хв до початку вимірювань з метою стабілізації роботи електроду його витримували за робочої напруги 0,60-0,65 В у дистильованій воді. Після цього попередньо нарізані фрагменти листкових пластинок завдовжки 2-3 мм і завширшки 1 мм загальною масою 70 мг вносили в комірку об'ємом 4 мл з ізотонічним розчином рН 5,2.



Інтенсивність поглинання кисню вимірювали протягом 10-15 хв за температури зовнішнього середовища +26 °С. Загальну інтенсивність поглинання кисню визначали без додавання інгібіторів. Інтенсивність ціанідрезистентного дихання вимірювали після додавання в реакційне середовище 10 мМ ціаніду калію (KCN). Діючу концентрацію KCN добирали експериментально.

## 2.9. Індукція флуоресценції хлорофілу

Функціональний стан тилакоїдів в інтактних листках *G. nivalis* оцінювали за показниками флуоресценції хлорофілу. Флуоресценцію хлорофілу *a* вимірювали флуорометром ХЕ-РАМ (Heinz Walz GmbH, Німеччина) при середній температурі +20 °С. Дані записували у форматі xls-файлів (Microsoft Excel) із застосуванням мультиметра UT-60E (Unitrend International Ltd., Тайвань), з'єданого з комп'ютером [242, 243]. Вимірювання проводили в такій послідовності. Досліджувані експериментальні і контрольні листки попередньо інкубували в темряві протягом 20 хв. Після цього вмикали вимірювальне світло (*ML*, Measuring Light) [244] з частотою 2 кГц і низької щільності  $0,2 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , яке не активує фотохімічні реакції, та реєстрували мінімальний рівень флуоресценції ( $F_0$ ) у адаптованих до темряви листків. Далі через 100 с вмикали на 1 с галогенову лампу, здійснюючи спалах насичуючого світла з щільністю  $3000 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , вимірювали максимальний рівень флуоресценції ( $F_m$ ). Через 200 с, після зниження флуоресценції до мінімального значення ( $F_0$ ), вмикали актинічне світло з щільністю 40, 80, 180, 350, 700, 1000  $\text{мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  відповідно до значень щільності потоку фотонів у природних умовах, для індукції флуоресценції хлорофілу *a*. Через 20 хв знову повторювали спалах насичуючого світла (з щільністю  $3000 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) тривалістю 1 с і вимірювали максимальний рівень флуоресценції  $F'_m$  в адаптованих до світла листків. Після цього через 20 с вмикали актинічне світло й визначали мінімальний рівень флуоресценції  $F'_m$  у адаптованих до світла листків. На основі виміряних вище показників флуоресценції хлорофілу *a* листків *G. nivalis*

обчислювали потенційний квантовий вихід фотохімії комплексів ФСII в адаптованому до темряви стані  $F_v / F_m$  та потенційний квантовий вихід в адаптованому до світла стані  $F'_v / F'_m$  за Максвеллом та Джонсон [245], фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP), та нефотохімічного гасіння флуоресценції (qN) за Шрейбером та ін. [246], реальний квантовий вихід електронного транспорту ( $\Phi_{PSII}$ ) за Дженті та ін. [247]. Швидкість перенесення електронів ЕТр ( $ETR$ ) обчислювали на основі величин ефективного квантового виходу ФСII ( $\Phi_{PSII}$ ), щільності потоку фотонів ЩПФ ( $PFD$ ) і коефіцієнту поглинання КП ( $AC$ ) за формулою:  $ETR = \Phi_{PSII} \cdot PFD \cdot 0,5 \cdot AC$  [244]. Припускали, що рівномірний розподіл фотосинтетичного активного випромінювання між ФСI і ФСII відображається коефіцієнтом поглинання 0,84 [248].

Щільність потоку фотонів над листками вимірювали пристроєм “LI-250 Light Meter” (Li-Cor Inc., США), оснащеним сферичним квантовим сенсором.

## 2.10. Статистична обробка кількісних даних

Виміряні під час експериментів абсолютні значення показників структури мітохондрій, хлоропластів і продихів, а також інтенсивності клітинного дихання і флуоресценції хлорофілу  $a$  листків *G. nivalis* опрацьовували із застосуванням комп'ютерної програми “Statistica 11.0”. Статистичні обчислення розпочинали з визначення нормальності розподілення даних у вибірковій сукупності. Середні значення досліджуваних показників, їх стандартне відхилення та стандартну похибку обчислювали з використанням вибірок, обсяг яких був не менше 30, а кратність повторності дорівнювала 9, тому похибка вимірювань на кожному листку не перевищувала 5%. Достовірність різниці середніх значень досліджуваних параметрів у експериментальних і контрольних зразках обчислювали із застосуванням  $t$ -критерію Стьюдента [249]. Різницю значень показників вважали достовірною при  $p \leq 0,05$ . Силу і напрям можливого зв'язку між факторними і результативними середніми значеннями параметрів обчислювали із

застосуванням коефіцієнту кореляційного зв'язку ( $r$ ). Зв'язок вважали відсутнім, якщо коефіцієнт кореляції  $r \leq 0,15$ .

### РОЗДІЛ 3

## МОРФОЛОГІЯ, АНАТОМІЯ ТА МІКРОСТРУКТУРА ПОВЕРХНІ ЛИСТКІВ *G. NIVALIS* НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ

Рослини, які ростуть в умовах холодного клімату, протягом еволюції адаптувалися до дії низьких температур. Пристосовані природним добором до холодного середовища дикорослі види рослин мають ряд морфологічних і фізіологічних механізмів для виживання в умовах тривалих холодних періодів [250].

В сучасних умовах планетарних змін клімату подальшого розвитку набули уявлення про адаптивне значення стану поверхні листків та продихів у стійкості рослин до низьких температур. Відомо, що продихи листків відіграють ключову роль у забезпеченні транспірації води та обміну вуглецю у рослин [251], тому їх функціонування здатне впливати на ефективність фотосинтетичного апарату. Припускали, що стан поверхні та розвиток продихів у листків *G. nivalis* залежать від впливу абіотичних факторів, зокрема, температури зовнішнього середовища. Зважаючи на це, з'ясування структурних особливостей поверхні та продихів листків ефемероїда сприятиме розкриттю їх ролі у механізмах адаптування листків весняного ефемероїду до впливу низьких температур.

### 3.1. Морфологічні особливості листків

У природних умовах помірного клімату на досліджуваній території Моквинського лісництва Рівненської області, розвиток цибулин *G. nivalis* у ґрунті супроводжувався їх переходом в активний стан. Поява листків ефемероїда припадала на лютий, коли температура повітря досягала  $-6,8$  °C. Через 14-18 діб після появи листків над поверхнею ґрунту, починалось квітнення рослин при температурі  $+4,9$  °C. Наприкінці травня на п'ятому році розвитку, після дозрівання плоду, листки ефемероїда поступово жовтіли і відмирили разом з цибулинами.

Відомо, що цибулини *G. nivalis* розміщуються групами і здатні регулювати глибину свого залягання в поверхневому шарі ґрунту. Тому навесні в результаті переходу цибулин в активний стан з листків, що з'являються над поверхнею ґрунту, формуються приземні пучки [2, 226].

Листки дорзовентрального типу, без опушення, амфістоматичні, плоскі, лінійної, вузьколанцетоподібної форми, на верхівці загострені, темно-зелені зі слабким сизим відтінком та поверхневим шаром воску (рис. 3.1).

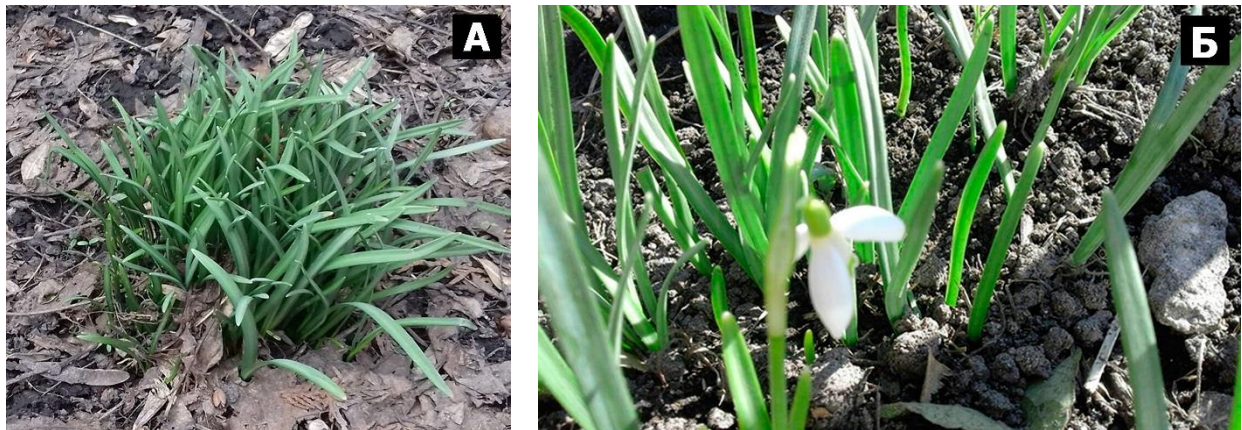


Рис. 3.1. Зовнішній вигляд рослин *G. nivalis* на вегетативному етапі (А) та під час квітнення (Б) протягом весняного розвитку за низьких температур.

В розвитку *G. nivalis* ріст листків здійснюється переважно збільшенням розмірів їх довжини. На кожному етапі розвитку рослин, починаючи з появи листків і до квітнення, довжина листків збільшувалась майже вдвічі, тоді як ширина, навпаки, змінювалась незначно (рис. 3.2). Зокрема, на пізній стадії вегетативного етапу розвитку ефемероїда, розміри довгої і короткої осей листків становили відповідно в середньому  $69,84 \pm 0,76$  мм та  $6,68 \pm 0,62$  мм ( $p \leq 0,05$ ), а під час квітнення вони збільшувались відповідно на 115,4% та 13,3%. Таке інтенсивне збільшення видовження листків, очевидно, зумовлено необхідністю швидкого розвитку за короткотривалий весняний період.

Протягом весняного періоду розвитку *G. nivalis* площа листків збільшувалась нерівномірно, однак загальна закономірність росту листків ефемероїда корелювала зі змінами температури атмосферного повітря,

особливо в період максимального збільшення площі листків перед бутонізацією рослин (рис. 3.3).

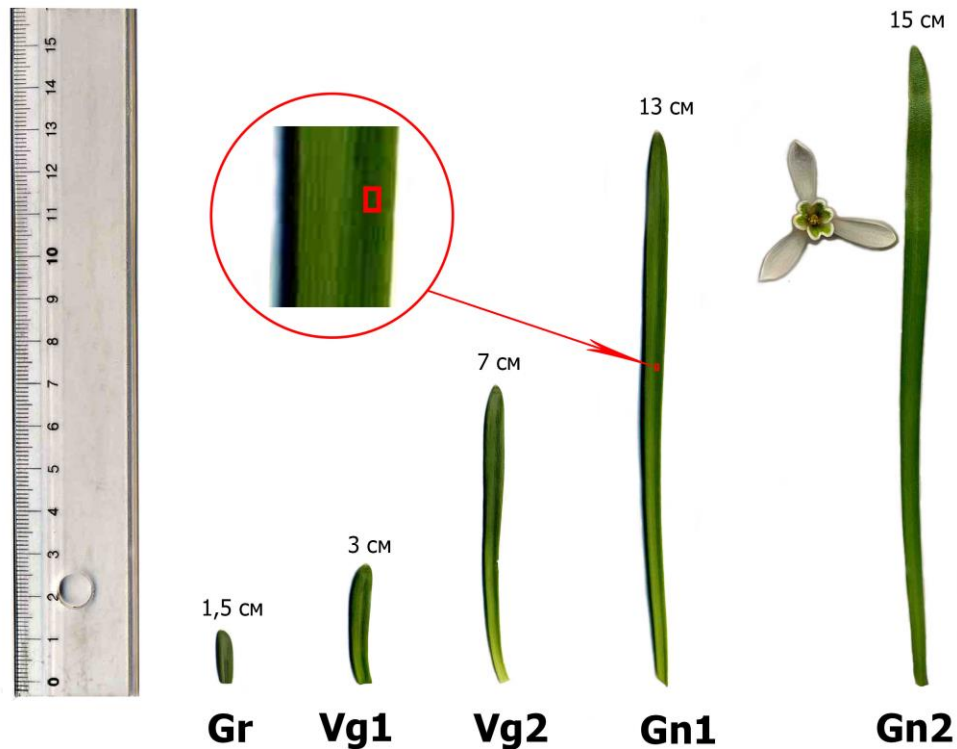


Рис. 3.2. Динаміка росту листків *G. nivalis* у весняний період при появі листків (Gr), на ранній (Vg1) і пізній (Vg2) стадіях вегетативного етапу, бутонізації (Gn1) та квітненні (Gn2); стрілкою позначено ділянку, з якої вирізали матеріал для мікро- і ультраструктурних досліджень.

Найповільніше збільшення площі листків виявлено після появи листків з ґрунту і (при переважанні середніх добових температур від  $-6,8$  до  $-6,5$  °C). Найбільші темпи росту листків ефемероїду припадали на пізній вегетативний і ранній генеративний етапи розвитку рослин при підвищенні температури атмосферного повітря вегетативного етапу і ранній стадії генеративного етапу росту рослин *G. nivalis*, в той час коли температури атмосферного повітря підвищувались від  $-6,5$  до  $+1,4$  °C.

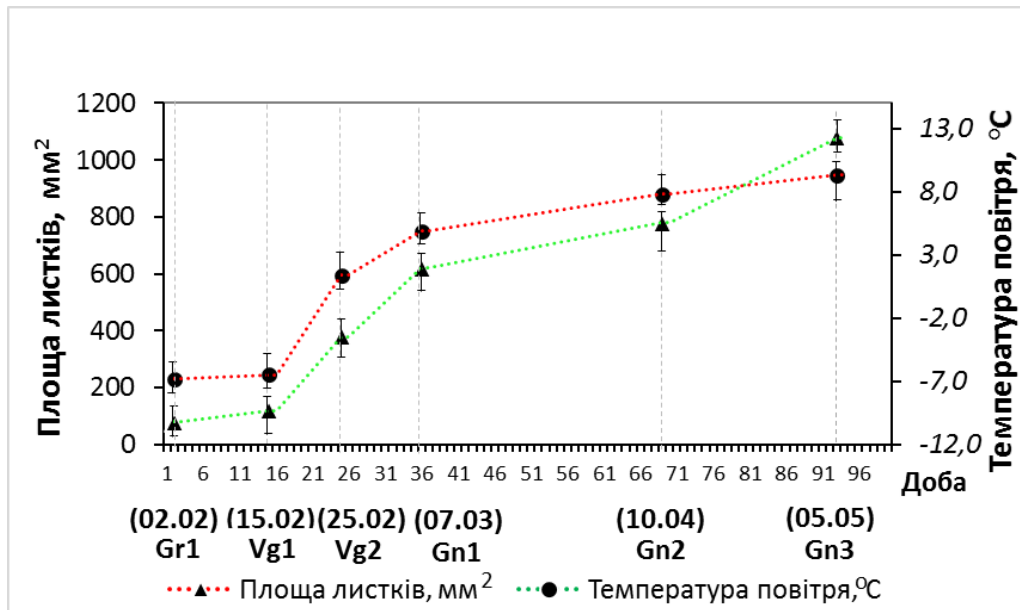


Рис. 3.3. Динаміка показників температури атмосферного повітря і площі листків *G. nivalis* (при  $p \leq 0,05$ ) від появи листків з ґрунту (Gr1), протягом раннього вегетативного (Vg1), пізнього вегетативного (Vg2), раннього генеративного (Gn1), середнього генеративного (Gn2) та до пізнього генеративного (Gn3) етапів весняного розвитку в природних умовах.

Різке уповільнення темпів росту листків простежувалось на початку бутонізації, яка припадала на початок березня, і до етапу квітнення, що співпадало з повільним підвищенням температури від  $+4,9$  °C до  $+7,8$  °C. Після квітнення на етапі плодоношення знову спостерігалось деяке прискорення темпів росту листків при подальшому рості температури атмосферного повітря від  $+7,8$  °C до  $+9,3$  °C (див. рис. 3.3).

### 3.2. Анатомічна будова листків

Спостереження на напівтонких зрізах листків *G. nivalis* показали, що анатомічна структура листків належить до ізолатерального типу, та є типовою для багатьох інших однодольних рослин. Епідермальні клітини вкриті товстим шаром кутикули (рис. 3.4). В епідермі чітко виділяються яскраво забарвлені замикаючі клітини продохів, занурені на третину нижче сусідніх епідермальних клітин (рис. 3.4 А, вставка).



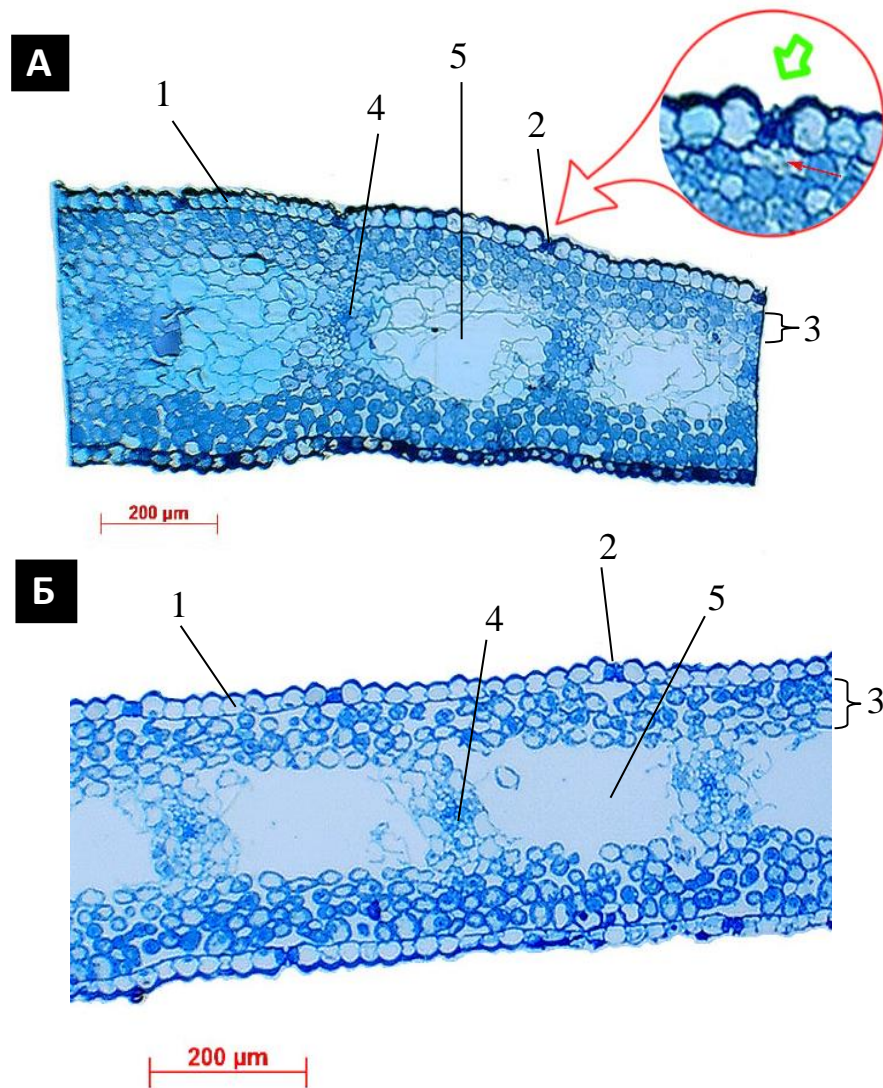


Рис. 3.4. Поперечні зрізи пластинок листків *G. nivalis* на вегетативному (А) і генеративному (Б) етапах весняного росту рослин: 1 – епідерма, 2 – продих, 3 – паренхіма, 4 – судинний пучок, 5 – порожнина (світлова мікроскопія).

Під продихами диференціюються відносно невеликі підпродихові порожнини. З обох сторін листків під епідермою клітини мезофілу утворюють однорідну паренхімну тканину, яка складається з 3-4 шарів клітин. Профілі мезофільних клітин мають округлу або овальну форму. Особливістю структури листків є великі центральні порожнини, які на вегетативному етапі розвитку рослин містять залишки клітинних стінок мертвих клітин (див. рис. 3.4А). Вважається, що такі порожнини поступово заповнюються слизовою речовиною, яка може сприяти підвищенню морозостійкості цих рослин [226, 252].



На генеративному етапі зустрічаються лише поодинокі профілі таких клітин в багатьох заповнених слизовою речовиною міжклітинних просторах, між якими виділяються судинні пучки, оточені клітинами обгортки (рис. 3.4 Б).

### 3.3. Мікроструктура поверхні листків

Епідерма адаксіальної та абаксіальної сторін листків *G. nivalis* складається з видовжених клітин прямокутної форми, злегка звужених на кінцях, між якими розміщені продихи [226].

Протягом вегетативного етапу розвитку рослин епідермальні клітини на абаксіальній поверхні листків більш видовжені на 9,7% і вужчі на 19,2% ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з адаксіальною поверхнею. Протягом етапу квітнення ці показники незначно збільшуються, зокрема, на абаксіальній поверхні листків довга вісь епідермальних клітин більша на 9,0%, а коротка вісь менша на 5,3% ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з адаксіальною поверхнею.

Епідермальні клітини листків *G. nivalis* на всіх етапах весняного розвитку вкриті кутикулою та епікутикулярним воском. Епідермальні клітини мають дещо опуклу форму і тому частково виступають відносно базового рівня поверхні, утворюючи горбисті підвищення (рис. 3.5 А, рис. 3.5 Б).

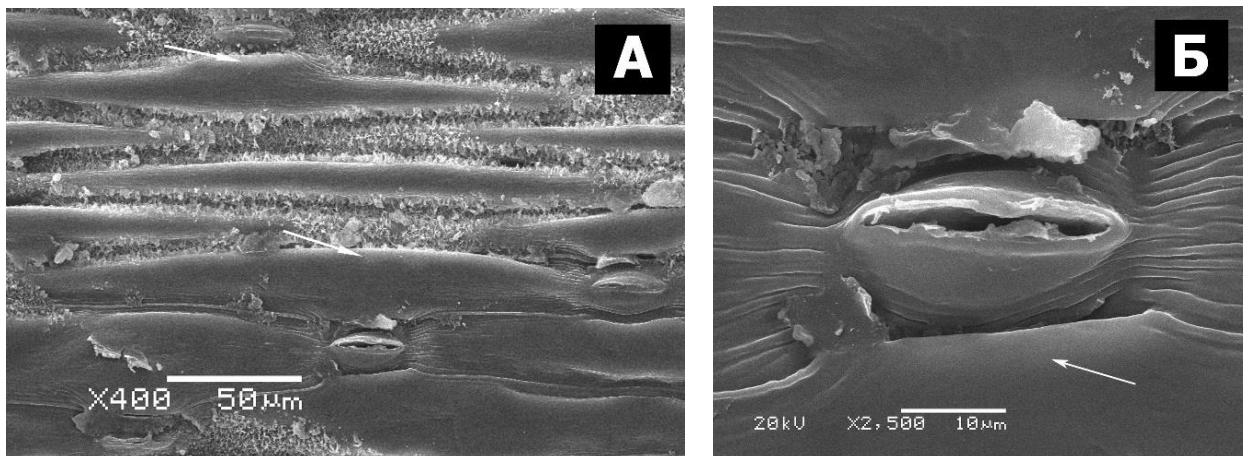


Рис. 3.5. Фрагменти абаксіальної поверхні листка *G. nivalis* на етапі квітнення: загальний вигляд (А), горбисті підвищення епідермальних клітин (позначені стрілками) поблизу продихів (Б) (сканувальна електронна мікроскопія).

Висота виступаючої частини епідермальних клітин протягом етапу появи листків з ґрунту на адаксіальній поверхні листків становила в середньому  $9,14 \pm 0,73$  мкм, а на абаксіальній поверхні  $8,93 \pm 0,61$  мкм ( $p \leq 0,05$ ). Протягом етапу квітнення ці показники в межах адаксіальної поверхні були меншими на 11,2%, а в межах абаксіальної поверхні на 18,4%.

Поблизу продихів (див. рис. 3.5 А, Б) висота виступаючої частини епідермальних клітин становила в середньому  $15,19 \pm 0,38$  мкм ( $p \leq 0,05$ ), тобто була на 79,6 % більшою, порівняно з горбистими ділянками, віддаленими від продихів. Припускаємо, що наявність горбистих виступаючих частин епідермальних клітин поблизу продихів сприяє їх захисту від руйнівного механічного впливу, який виникає ранньою весною, коли молоді листки з'являються на поверхні ґрунту і просуваються крізь шар опалого листя та сніговий покрив.

На поверхні кутикули абаксіальної та адаксіальної поверхонь листків *G. nivalis* характерна наявність кристалоїдів епікутикулярного воску у вигляді пластинок вигнутої форми, згрупованих у зірчасті фігури (рис. 3.6). Віск характеризується різними типами структурованості: складається з розсічених і цілокраїх, лопатеподібних пластинчастих, загострених або округлих на кінцях стрижнеподібних кристалоїдів, нерівномірно розташованих по всій поверхні листових пластинок, інколи чергуючись з ділянками, де кристалоїди відсутні як на абаксіальній, так і на адаксіальній поверхнях (рис. 3.6 Б, Г).

Протягом появи листків з ґрунту, на адаксіальній поверхні листків висота окремих кристалоїдів воску була більшою на 31,4 % порівняно з таким показником на абаксіальній поверхні ( $1,88 \pm 0,14$  мкм) при  $p \leq 0,05$ . Зворотна тенденція проявлялась у зміні діаметру основи воскових зіркоподібних фігур, який був меншим на 21,8% порівняно з абаксіальною поверхнею ( $2,52 \pm 0,21$  мкм). При цьому, відстань між вершинами воскових фігур на адаксіальній поверхні була меншою в середньому на 29,2%, порівняно з абаксіальною поверхнею ( $3,36 \pm 0,39$  мкм) ( $p \leq 0,05$ ). Такі особливості структури кристалоїдів

на адаксіальній поверхні зумовлюють формування простору з численними більш увігнутими ділянками, порівняно з абаксіальною поверхнею.

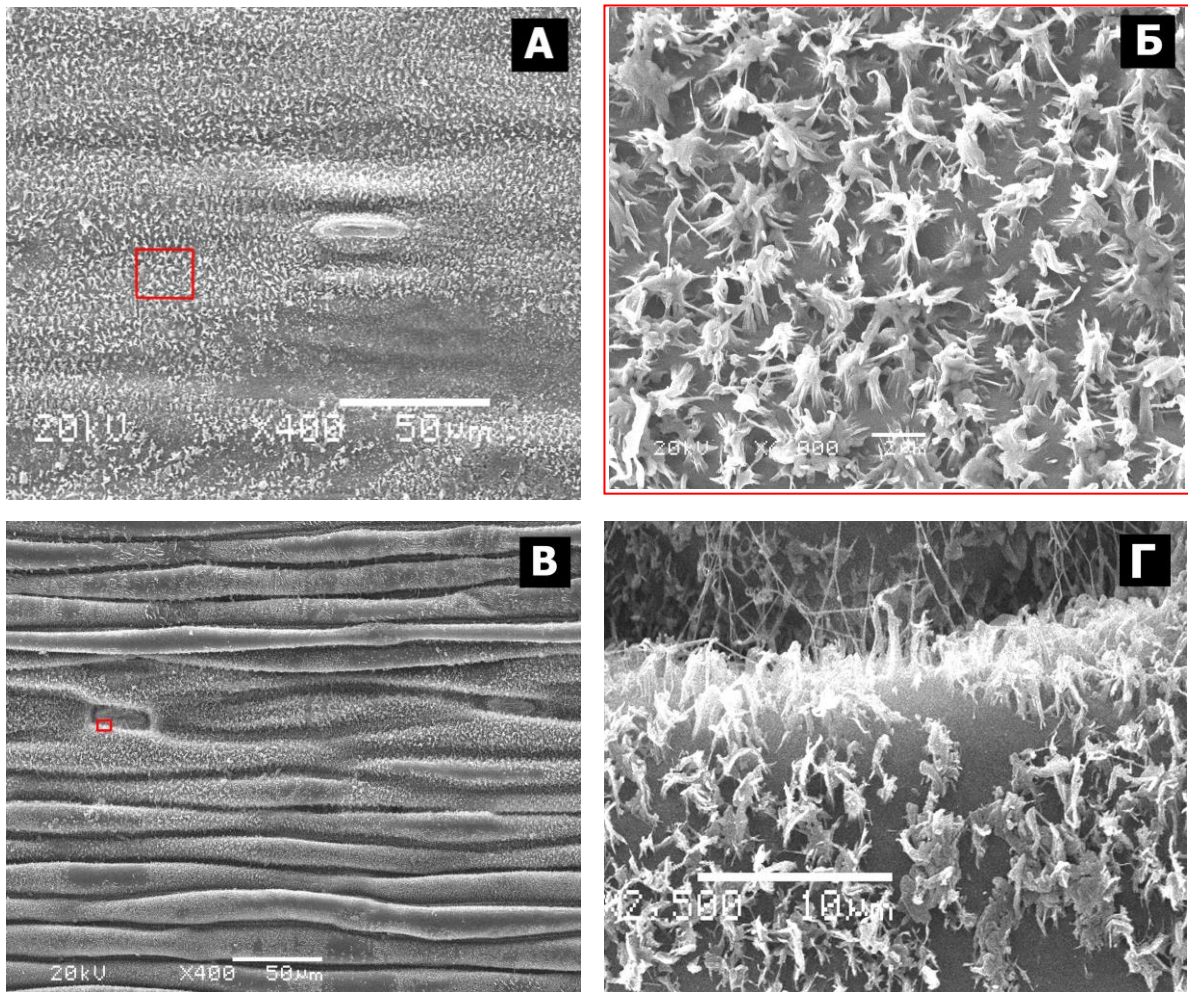


Рис. 3.6. Фрагменти адаксіальної (А, Б) та абаксіальної (В, Г) поверхонь листків *G. nivalis* на вегетативному етапі весняного розвитку: загальній вигляд (А, В) та воскові кристалоїди (Б, Г) (сканувальна електронна мікроскопія).

Епікутикулярний віск обмежує доступ до пор і бере участь в регулюванні поглинання світла, яке надходить до поверхні листових пластинок. Захист листків від надмірного потоку фотонів забезпечується розсіюючими властивостями воскового покриву (рис. 3.7), що формується завдяки постачанню воску через пори в кутикулі [253].

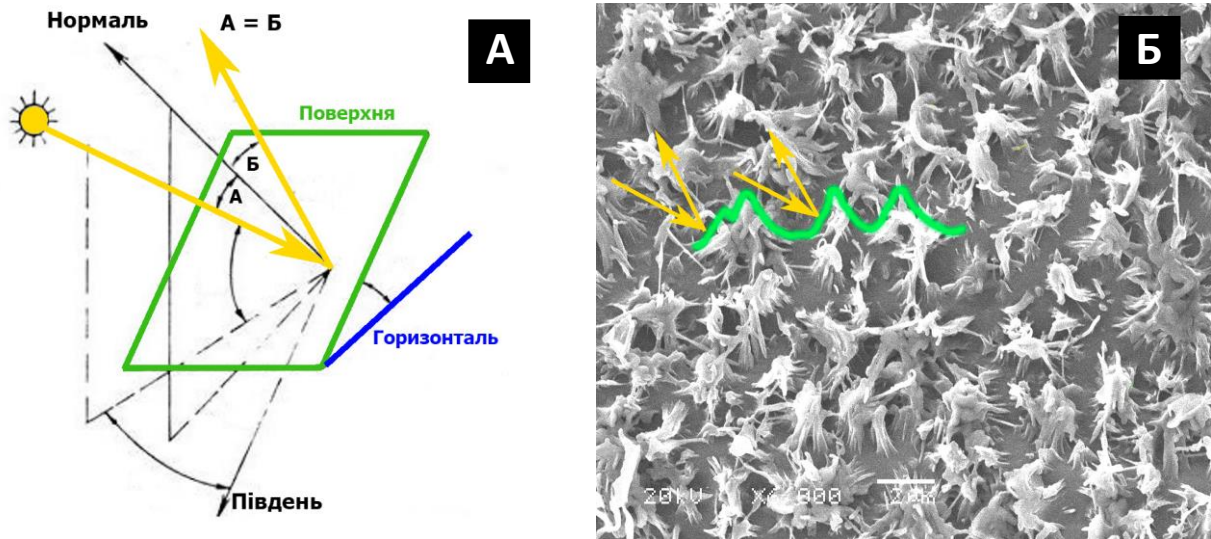


Рис. 3.7. Схема розсіювання променів світла [254] (А) восковими кристалоїдами на поверхні кутикули листків *G. nivalis* (Б) (сканувальна електронна мікроскопія, масштаб Б – 2  $\mu\text{m}$ ).

Припускаємо, що віск у формі увігнутої дуги здатний розсіювати потік фотонів і захищати фотосинтетичний апарат від впливу надмірного освітлення [253, 255]. Виявлені у *G. nivalis* кристалоїди воску з численними виступами і заглибинами, формують горбисту поверхню, яка здатна преломлювати та розсіювати надмірний потік фотонів. На наш погляд, це сприяє адаптації листків до високого рівня освітлення протягом весняного періоду розвитку, коли у лісі верхні яруси крони дерев без листків пропускають до поверхні ґрунту потужний потік фотонів.

### 3.4. Структурні особливості продихів

Продихи листків у *G. nivalis* належать до аперігенного типу. У них відсутні супровідні клітини, подібно до інших ефемероїдів та лілейних [256–258]. Продихи розташовані майже рівномірно на обох поверхнях листових пластинок (амфістоматично) і орієнтовані паралельно довгій осі листків (рис. 3.8).

Замикаючі клітини продихів оточені чітко вираженим кутикулярним валиком і дещо занурені в епідерму, а їх центральна частина з продиховою



щільною незначно виступає над ними (рис. 3.9). На фотографічних зображеннях продихів зі значним збільшенням помітно, що продихи вкриті шаром структурованого воску (див. рис. 3.9).

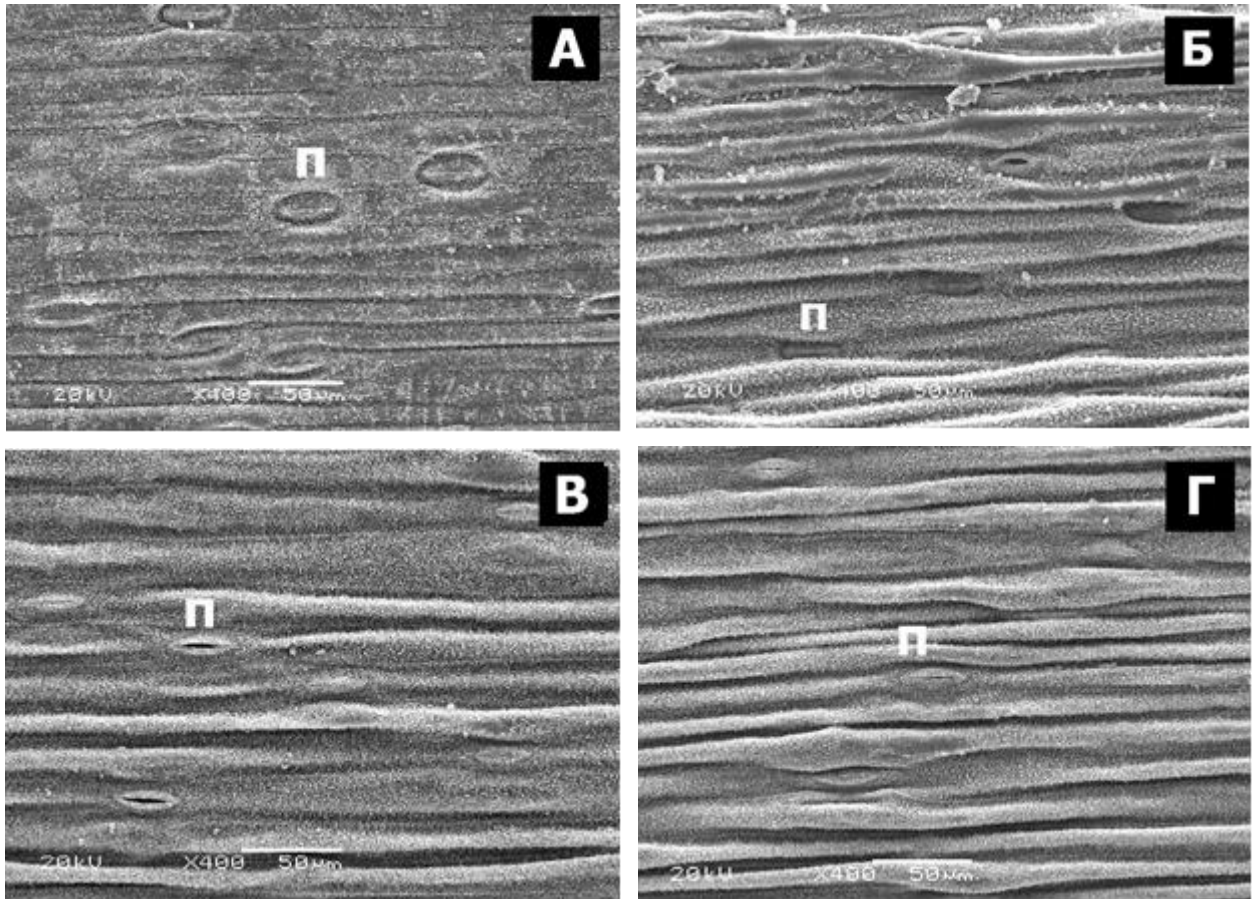


Рис. 3.8. Фрагменти поверхні листків *G. nivalis* на етапах появи листків з ґрунту (А, Б) і квітнення (В, Г) на адаксіальній (А, В) та абаксіальній (Б, Г) сторонах: П – продихи (сканувальна електронна мікроскопія).

Морфометричний аналіз листків *G. nivalis* показав, що на етапах появи з ґрунту та квітнення ефемероїда, у листків виражені схожі та відмінні ознаки продихів. Зокрема, протягом етапу появи листків, щільність продихів (їх кількість на 1 мм<sup>2</sup> площі поверхні листка) досягала максимальної величини  $114,75 \pm 6,56$  ( $p \geq 0,05$ ) на абаксіальній поверхні листків, що лише на 6% перевищувало цей показник на адаксіальній поверхні. Подібна незначна різниця щільності продихів на обох сторонах листків спостерігалась і на етапі квітнення [259].

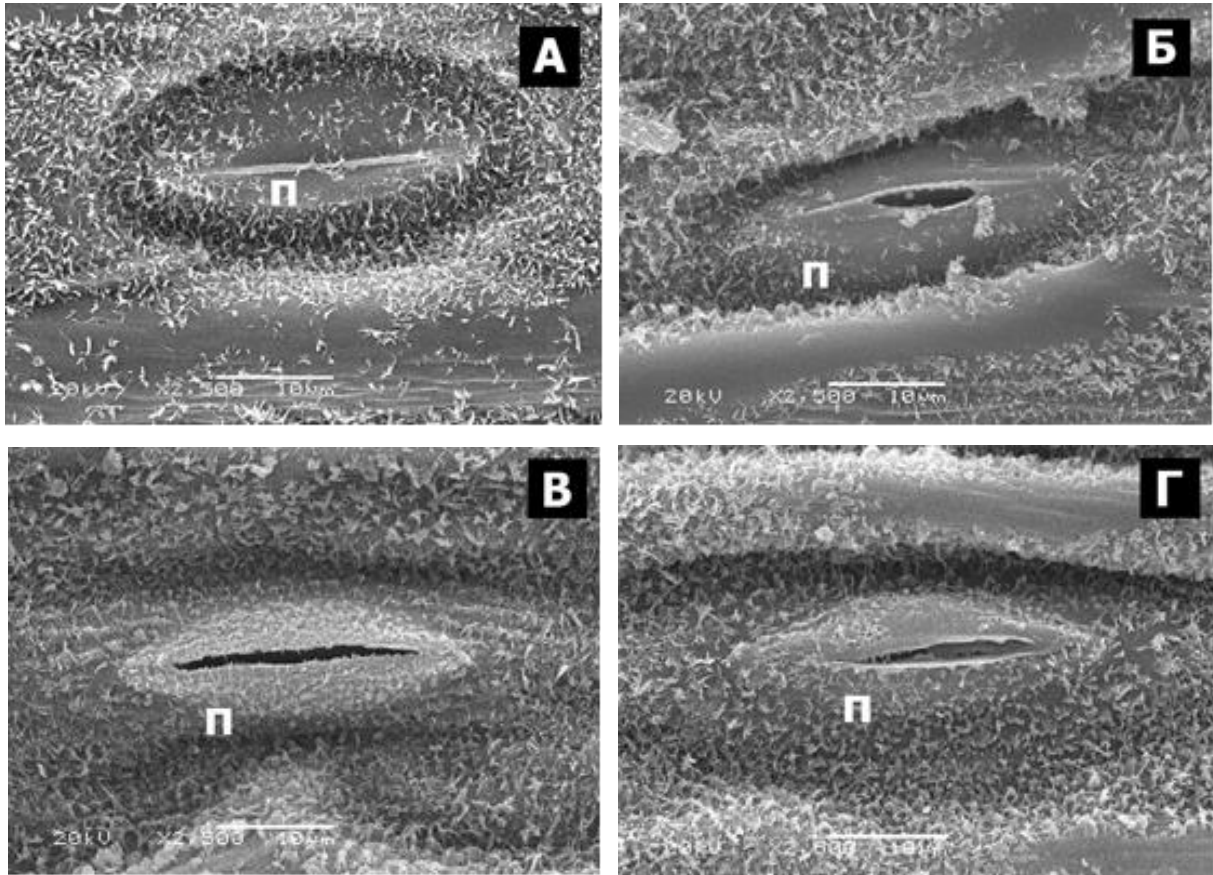


Рис. 3.9. Продихи листків *G. nivalis* на етапах появи листків з ґрунту (А, Б) і квітнення (В, Г) на адаксіальній (А, В) та абаксіальній (Б, Г) сторонах: продихи (П) (сканувальна електронна мікроскопія).

Стосовно закономірностей щільності продихів, розташованих попарно на абаксіальній та адаксіальній поверхні у рослин порівнюваних вікових груп виявлено, що ці параметри у молодих листків зі статистичною достовірністю ( $p \leq 0,5$ ) перевищували на 32% аналогічні значення у листків в період квітнення рослин (рис. 3.10 А). Така кількість продихів у листках *G. nivalis* характерна для груп рослин з дуже малою ( $10-100 \text{ мм}^2$ ) та малою ( $100-160 \text{ мм}^2$ ) щільністю за шкалою Мирославова [260].

Довжина продихів *G. nivalis* досягала близько 30 мкм за винятком цього параметра на абаксіальній стороні листків у стадії появи листків ( $35,78 \pm 2,27$  мкм), який на 17% ( $p \leq 0,5$ ) перевищував цей показник на адаксіальній стороні (рис. 3.10 Б).

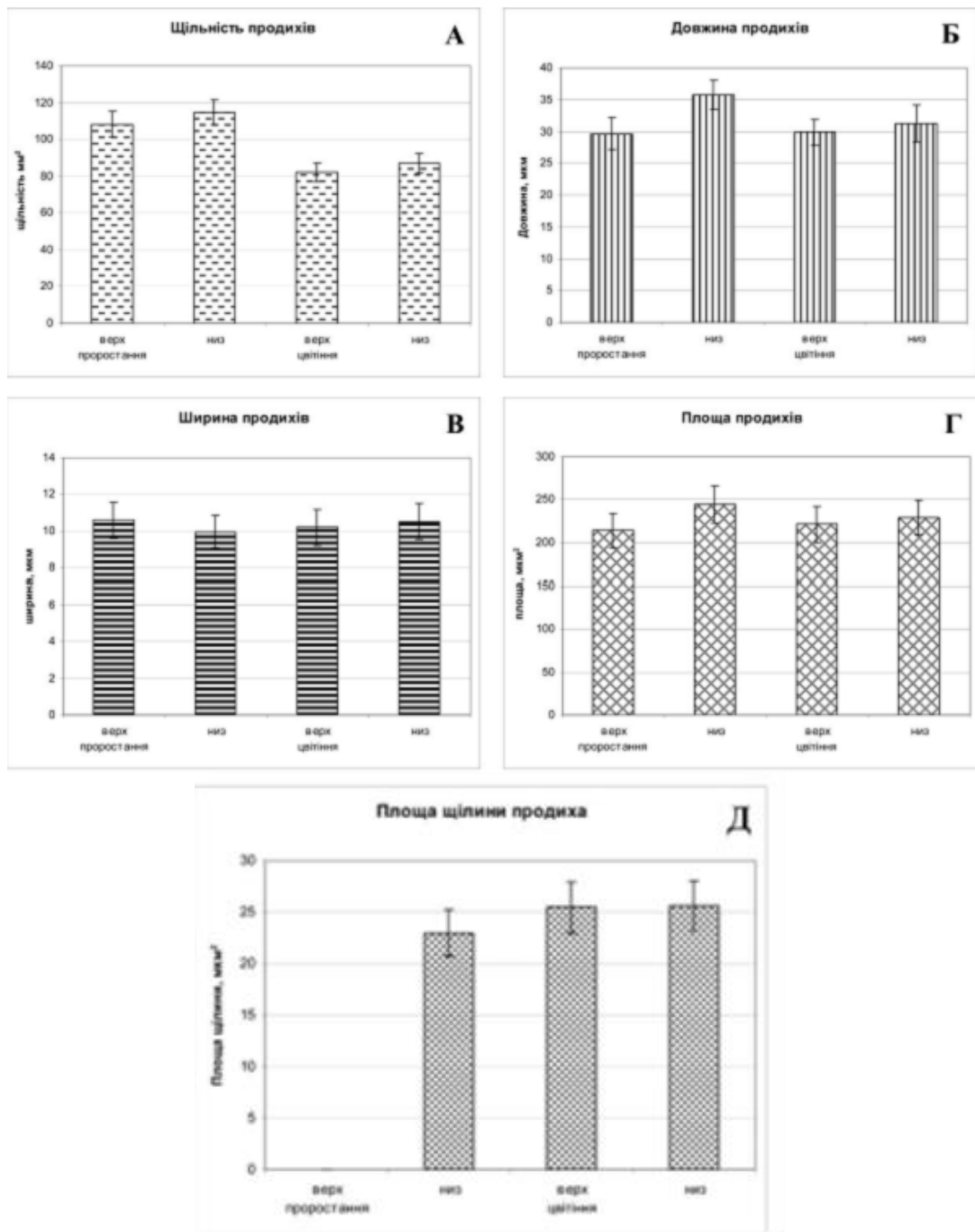


Рис. 3.10. Кількісні параметри продохів адаксіальної та абаксіальної сторін листків *G. nivalis* на стадіях появи листків з ґрунту та квітнення: щільність (А), довжина (Б), ширина (В), площа (Г) продохів та площа продихової щілини (Д).

Протягом етапу квітнення довжина продохів на адаксіальній стороні листків була незначно вищою на 3,9 %, порівняно з абаксіальною стороною ( $27,96 \pm 1,92$  мкм,  $p \leq 0,05$ ). Ці дані відрізняються від результатів досліджень,

отриманих Боковим та співавторами [261], у яких діаметр продихів листків *G. nivalis* досягав 40-50 мкм, що, очевидно, пояснюється різними методами підготовки та дослідження матеріалу, а також морфологічними відмінностями різних популяцій даного ефемероїда [262].

Розмір короткої осі продихів на обох сторонах листків *G. nivalis* протягом весняного періоду розвитку становив в середньому  $10 \pm 0,11$  мкм (рис. 3.10 В). При цьому, протягом етапу появи листків з ґрунту, цей показник був нижчим на 11,3% на адаксіальній поверхні, порівняно з абаксіальною поверхнею ( $11,27 \pm 0,17$  мкм) ( $p \leq 0,05$ ) (див. рис. 3.10 В). Протягом етапу квітнення коротка вісь продихів на адаксіальній стороні листків також була нижчою на 6,5%, порівняно з абаксіальною стороною ( $12,17 \pm 0,13$  мкм). Отже, істотних відмінностей розмірів продихів у листках *G. nivalis* нами не встановлено, що вказує на їх генетичну детермінованість, а не чутливість до впливу внутрішніх та зовнішніх факторів [263]. Закономірність зміни площі продихів *G. nivalis* подібна до змін довжини продихів (рис. 3.10 Г), але статистично значимих відмінностей цього параметру не виявлено ( $p \geq 0,05$ ).

Площа продихової щілини на абаксіальній та адаксіальній сторонах листків протягом етапу появи листків з ґрунту значно відрізнялась. Зокрема, на абаксіальній стороні листків площа щілини становила в середньому  $22,98 \pm 2,28$  мкм<sup>2</sup>, а на адаксіальній поверхні усі продихи були закритими (див. рис. 3.9 і 3.10 Д). Протягом етапу квітнення рослин площа продихової щілини на абаксіальній та адаксіальній сторонах листків майже не відрізнялась і становила відповідно в середньому  $25,44 \pm 2,51$  та  $25,57 \pm 2,43$  мкм<sup>2</sup>. Варто зазначити, що частка продихів з різним ступенем відкриття від загальної кількості продихів на абаксіальній стороні молодих листків на етапі появи листків з ґрунту складала біля 20%, тоді як на стадії квітнення цей параметр збільшувався до 30% і на адаксіальній поверхні він досягав 59%.

Рослини, пристосовані до росту та розвитку при низьких температурах, зокрема й ефемероїди, можуть поглинати воду з ґрунтів, навіть близько її точки замерзання, проте це може призвести до втрати води шляхом



випаровування [250]. Щоб запобігти цьому ефемероїди застосовують механізм повного закриття продихів, що спостерігалось нами на адаксіальній поверхні, та лише часткового їх відкриття (у близько 20% продихів) на абаксіальній поверхні молодих листків *G. nivalis*, проте, в період квітнення, навпаки, відсоток відкритих продихів на адаксіальній стороні досягав 59% і на абаксіальній – 30%. Отже, на основі отриманих даних вважаємо, що рівень продихової транспірації у молодих листків *G. nivalis* є досить низьким, принаймні, меншим, порівняно з періодом квітнення. Структурна організація поверхні листків і продихів є важливою складовою загальної стратегії регулювання газообміну ефемероїда за низьких температур.

Варто зауважити, що лінійні розміри продихів та їх площі залишалися майже однаковими, незалежно від етапу розвитку рослин підсніжника, як це спостерігалось і у 34 інших трав'яних видів [264]; проте довжина продихів *G. nivalis* майже втричі переважала їх ширину (див. рис. 3.10 Б та 3.9 В). Згідно з моделлю Аасамаа зі співаторами [265] провідність продихів зворотно корелює з довжиною і шириною замикаючих клітин. Замикаючі клітини з більшою шириною створюють високий рівень інерції руху, яка важлива для запобігання дуже високій провідності продихів [265].

Окрім продихової транспірації існує також і кутикулярна транспірація. Інтенсивність кутикулярної транспірації сильно варіює у різних видів: від зовсім незначних втрат до 50% загальної транспірації [266]. Кутикула варіює за складом і за товщиною. У молодих листків з тонкою кутикулою цей вид транспірації охоплює близько 50% її загального об'єму; у зрілих листків з більш товстою кутикулою кутикулярна транспірація становить лише 1/10 від загальної; у старіючих листках кутикулярне випаровування води може знову зростати через руйнування і розтріскування кутикули [267]. Кутикулярна транспірація регулюється переважно шаром кутикули [268]. Більш розвинута кутикула характерна для листків посухостійких рослин, порівняно з вологолюбними [269]. Види хвойних, що мають товстий кутикулярний шар, втрачають дуже мало води через епідерміс листка [270], і навпаки, види з

тонким шаром кутикули продовжують втрачати воду і після того, як продихи закриваються, через це вони набагато сильніше страждають від посухи.

Кутикула є позаклітинним ліпофільним біополімером, що складається з кутину, вуглеводів клітинної стінки та розчинних кутикулярних ліпідів, які часто називають кутикулярними восками [271]. Віск занурено в полімерну матрицю (інтракутикулярний), а також спостерігається на поверхні листка (екстракутикулярний) [272]. Кутин є біополімером, який складається з похідних C16 та C18 жирних кислот з 2-3 гідроксильними групами, ці кислоти з'єднані одна з одною в ланцюжки за допомогою ефірних зв'язків [269, 273].

Нами показано, що товщина кутикули та її щільність у листків *G. nivalis* були достатньо високими. На поверхні кутикули дуже часто виявлялися відкладення епікутикулярного воску з різною структурою: від пластинчастих, лопатеподібно-пластинчастих до стрижнеподібних кристалоїдів, які нерівномірно розподілялися по всій поверхні листової пластинки (див. рис. 3.6). Останній тип, тобто стрижнеподібні кристалоїди, можна бачити і на мікрофотографіях поверхні молодих листків *G. nivalis*, отриманих на світловому електронному мікроскопі німецькими дослідниками [274], які вивчали процеси росту епікутикулярних восків за допомогою атомної силової мікроскопії (АСМ). Отримані ними результати продемонстрували, що ріст кристалоїдів на листках підсніжника білосніжного відбувався досить швидко (в 12 разів швидше, порівняно з листками *Euphorbia lathyris*). Також було виявлено, що на ранній фазі кристалоїди росли переважно горизонтально і в одному основному напрямку, а потім починали тягнутися вгору. Дані АСМ показали, що восковий матеріал рухався до певних плям на кутикулі, вказуючи на латеральний рух молекул воску та етапи росту шарів і кристалів. Таким чином, регенерація епікутикулярних ліпідів на поверхнях живих рослин є дуже динамічним і порівняно стрімким процесом, що відображає важливість безперервного зовнішнього покриття листка [274]. В цьому контексті, Рейнхардт і Рідерер [275] підкреслювали важливість зон кристалічного та

аморфного рослинного воску в регуляції дифузії молекул через транспортний бар'єр.

Отже, головною ознакою поверхні листків *G. nivalis* є добре розвинена кутикула і наявність товстого шару епікутикулярного воску. Продихи розташовані на обох сторонах листків нижче рівня епідерми. Стабільними показниками є ширина та довжина продихів, а також площа продихів і їх щільності. Виявлені структурна організація поверхні листка і продихів, а також особливість повного закриття продихів на абаксіальній поверхні та закриття близько 20 % продихів на абаксіальній поверхні молодих листків викликало припущення, що ця закономірність може бути пов'язана із загальною стратегією забезпечення дихання рослин за високої освітленості і мінусових температур у весняний період. Результати дослідження змін структурно-функціональної організації мітохондрій і їх роль в адаптації дихання до низьких температур викладено в наступному розділі.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3, були опубліковані у статті: Білявська НО, Федюк ОМ (2018) Мікроструктура поверхні листків *Galanthus nivalis* L. на ранньовесняних етапах розвитку. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(44): 50-58.

## РОЗДІЛ 4

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ МІТОХОНДРІЙ МЕЗОФІЛУ ЛИСТКІВ *G. NIVALIS* ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

У розділі наведено дані про структурні зміни мітохондрій мезофілу листків *G. nivalis*, а також зміни інтенсивності загального і ціанід-резистентного дихання на різних етапах весняного розвитку ефемероїда з метою виявлення їх зв'язку з механізмами адаптації до впливу низьких температур. Особливості ультраструктурних змін мітохондрій виявляли за співвідношенням змін показників площі клітин, мітохондрій і крист під час появи листків на поверхні ґрунту, вегетативного та генеративного етапів розвитку ефемероїда.

Для дослідження особливостей структури мітохондрій з використанням методів електронної мікроскопії, відбирались клітини другого шару мезофілу на адаксіальній стороні листків рослин *G. nivalis* (рис. 4.1).

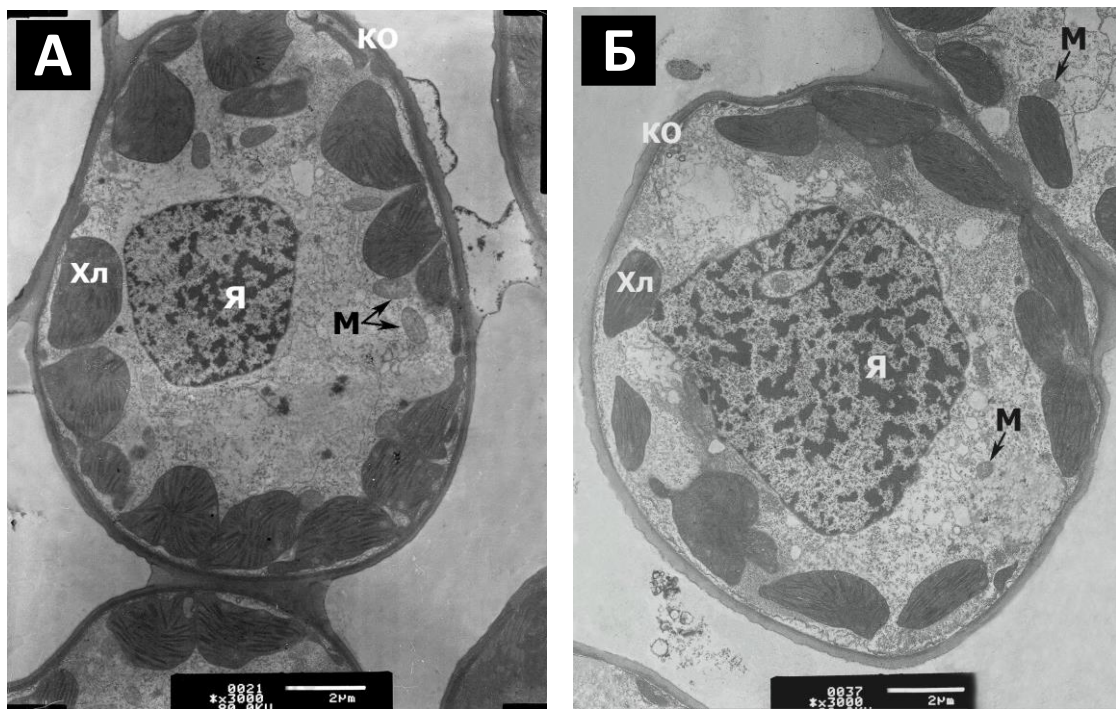


Рис. 4.1. Клітини другого шару мезофілу листків *G. nivalis* на вегетативному (А) і генеративному (Б) етапах весняного розвитку.

Виявлено, що на початку появи листків на поверхні ґрунту, коли температури ще досить низькі, профілі зрізу клітин мезофілу мають овальну та іноді округлу форми (рис. 4.1 А). У них зберігаються ознаки, властиві клітинам меристеми: збільшене ядро, відносно тонкі клітинні оболонки (до 3-4 мкм), порівняно слабо вакуолізовані. Хлоропласти переважно амебоїдної форми з численними виростами (струмулами), розташовані по периферії клітини, вздовж клітинної оболонки; на зріз клітини припадає від 10 до 16 профілів цих органел. Клітини мезофілу мають досить добре розвинений ендоплазматичний ретикулум (ЕР) гранулярного та агранулярного типів. Зрідка на зрізах є диктіосоми. Гіалоплазма заповнена численними рибосомами.

Під час квітнення форма профілів клітин мезофілу не змінювалась, як і товщина клітинної оболонки (рис. 4.1 Б). Ядро розташовувалось в центрі клітини і в ньому були глибокі заглибини. Дещо збільшувались кількість та розміри вакуолей порівняно з клітинами на вегетативному етапі. Форма хлоропластів наближалась до лінзовидної, зменшувались кількість струмул і хлоропластів в розрахунку на клітину. Зокрема, кількість хлоропластів на зрізі клітини варіювала від 8 до 12, їх локалізація в клітині залишалась незмінною. В гіалоплазмі часто зустрічались цистерни гранулярного ЕР та зони, обмежені мембранами агранулярного ЕР. Привертає увагу наявність зон гіалоплазми з високою концентрацією рибосом, які можна помітити у верхній частині клітини, зображеної на рис. 4.1 Б.

Як видно з рис. 4.2, середні значення площі клітин мезофілу були мінімальними на етапі появи листків на поверхні ґрунту (Gr1) і не перевищували  $7,2 \cdot 10^2$  мкм<sup>2</sup>. Максимальне збільшення площі зрізу клітин мезофілу в середньому до  $1,1 \cdot 10^3$  мкм<sup>2</sup> зафіксовано на пізній стадії генеративного етапу (Gn3) розвитку.

В природних умовах весняного розвитку листків *G. nivalis* простежувалась загальна закономірність поступового збільшення розмірів клітин мезофілу. При цьому, лише під час стадії квітнення на генеративному

етапі (Gn2) розміри площі клітин мезофілу були дещо меншими порівняно зі стадією бутонізації на генеративному етапі (Gn1) розвитку рослин.

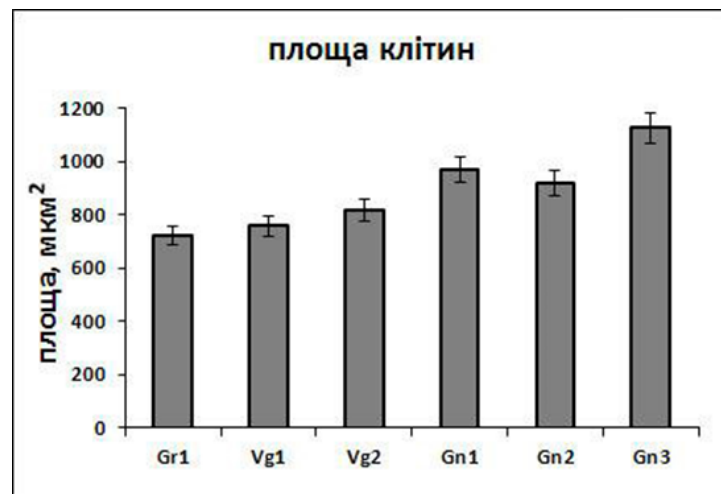


Рис. 4.2. Динаміка показників площі клітин мезофілу в листках *G. nivalis* при появі листків з ґрунту (Gr), на вегетативному (Vg) і генеративному (Gn) етапах весняного розвитку в природних умовах.

На наш погляд, помітне збільшення площі мезофільних клітин в листках, пов'язане з підвищенням температури атмосферного повітря і необхідністю активування метаболічних процесів на генеративному етапі розвитку рослин.

#### 4.1. Ультраструктурні зміни мітохондрій на різних етапах розвитку

##### 4.1.1. Вплив температури атмосферного повітря

Результати наших експериментів показали, що на п'ятому році розвитку рослин *G. nivalis*, коли передбачена поява і цвітіння квітки, форма мітохондрій листків змінювалась на кожному етапі весняного розвитку ефемероїда. Найбільше відрізнялись розміри площі і об'єму крист мітохондрій на вегетативному і генеративному етапах розвитку.

На початку етапу появи листків за середньої температури атмосферного повітря  $-3,7$  °C, мітохондрії були переважно округлої форми зі слабо розвинутими кристами (рис 4.3 А) без ознак руйнування, що вказує на їх

здатність витримувати вплив мінусових температур при підготовці до подальшого інтенсивного продукування АТФ.

При переході *G. nivalis* до вегетативного етапу за температури атмосферного повітря  $+4,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , коли довжина листків досягала  $3,12\pm 0,07\text{ см}$ , мітохондрії були вже більш розвинутими, видовженішими, прослідковувалось збільшення площі крист на зрізах (рис 4.3 Б) завдяки збільшенню їх довгої осі на 37% порівняно з початковим етапом появи листків на поверхні ґрунту. Збільшення розмірів крист і переважання видовженої форми мітохондрій вказують на готовність мітохондріону до інтенсивного продукування АТФ, навіть за низьких температур, адже у лютому інколи протягом кількох діб середньодобові значення температури атмосферного повітря не піднімались вище  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

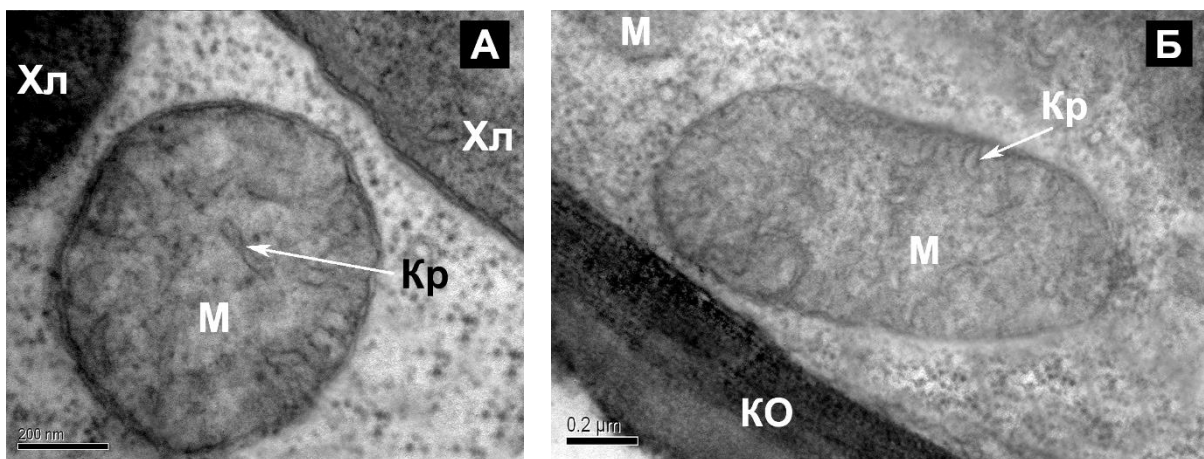


Рис. 4.3. Форма мітохондрій на початку появи листків з ґрунту листків (А) та наприкінці етапу появи листків з ґрунту (Б) за температур атмосферного повітря відповідно  $-3,7$  та  $+4,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Порівняно з етапом появи листків з ґрунту, протягом вегетативного етапу розвитку, до появи бутонів, коли температура атмосферного повітря змінювалась в середньому у межах від  $-3,6$  до  $+2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , мітохондрії мезофілу листків не руйнувались, а завдяки збільшенню їх довгої осі на 142% були максимально видовженими і мали конденсовану конфігурацію, для якої характерний щільний матрикс та добре розвинуті вузькі кристи (рис. 4.4).

Значне збільшення площі крист і видовження форми мітохондрій на зрізах пов'язане з їх високою функціональною активністю, тому це можна розглядати як адаптивну реакцію ефемероїда на вплив низьких температур зовнішнього середовища на вегетативному етапі розвитку.

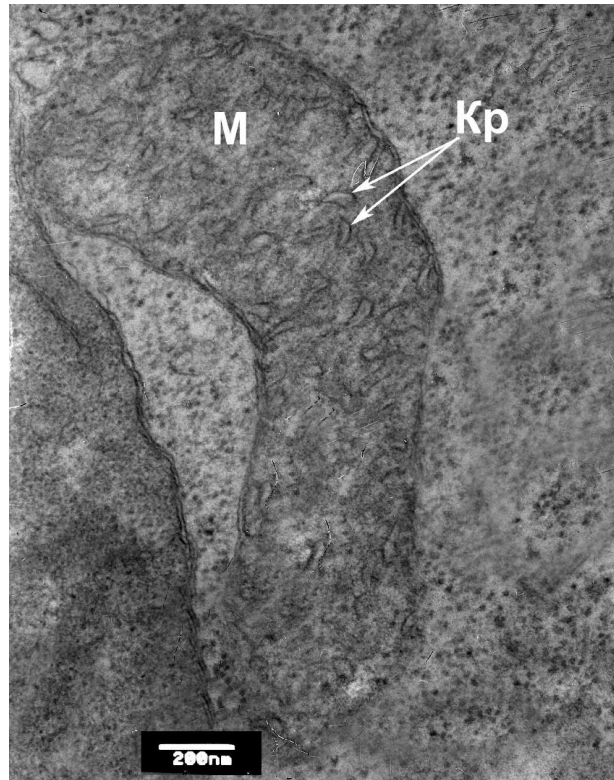


Рис. 4.4. Форма мітохондрій листків *G. nivalis* наприкінці вегетативного етапу весняного розвитку за температури атмосферного повітря  $+2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

На початку етапу бутонізації, порівняно з попереднім вегетативним етапом за умов підвищення температури атмосферного повітря в середньому до  $+3,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , довжина довгої осі мітохондрій зменшувалась в середньому на 113 % та короткої осі на 12,9 %, тому видовження форми мітохондрій теж значно зменшувалось (рис 4.5 А). В подальшому, наприкінці етапу бутонізації та протягом квітнення, з підвищенням температури атмосферного повітря в середньому до  $+8,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , кристи не зазнавали руйнування, але прослідковувалась тенденція зменшення їх довгої осі на 36,6 % і збільшенню короткої осі на 8,8 %, тому вони набували більш округлу форму (рис 4.5 Б).



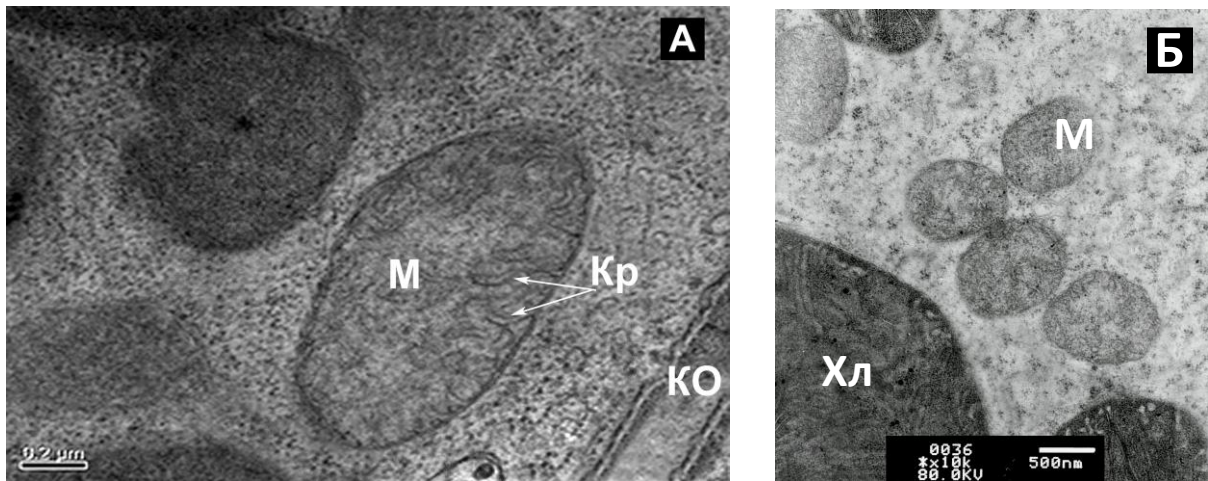


Рис. 4.5. Форма мітохондрій листків *G. nivalis* на початку етапу бутонізації (А) та наприкінці етапу бутонізації (Б) за температур атмосферного повітря відповідно +3,1 та +8,9 °С.

Зменшення розмірів площі зрізу крист та мітохондрій на генеративному етапі, тобто під час бутонізації і квітнення *G. nivalis* очевидно пов'язане зі зменшенням впливу низьких температур атмосферного повітря і відповідно відсутністю потреби підвищення інтенсивності метаболічних процесів в клітинах листків.

#### 4.1.2. Вплив температури ґрунту

Дослідження впливу температури ґрунту на структуру листків *G. nivalis* в природних умовах, показало, що на етапі появи листків на поверхні ґрунту їх температура була вищою порівняно з температурою ґрунту.

На початку етапу появи листків з ґрунту при переважанні температури поверхневого шару ґрунту  $-5,1$  °С мітохондрії на зрізі клітин були переважно округлої форми. Довжина їх короткої осі була у 1,2 рази меншою порівняно з довгою віссю. Неконтрастні мембрани крист вказують на те, що мітохондрії хоч і не зазнавали руйнування або стресу, але перебували в неактивному функціональному стані. Наприкінці етапу появи листків з ґрунту при переважанні температури поверхневого шару ґрунту  $+4,03$  °С температура листків була вище у 1,4 рази, порівняно з температурою ґрунту (рис. 4.6 А,

4.6 Б). Кристи не зазнавали руйнування і перебували в активному стані. У переважній більшості мітохондрій форма залишалась округлою, проте, у невеликої їх частини незначно змінювалась на видовжену (рис. 4.6 В).

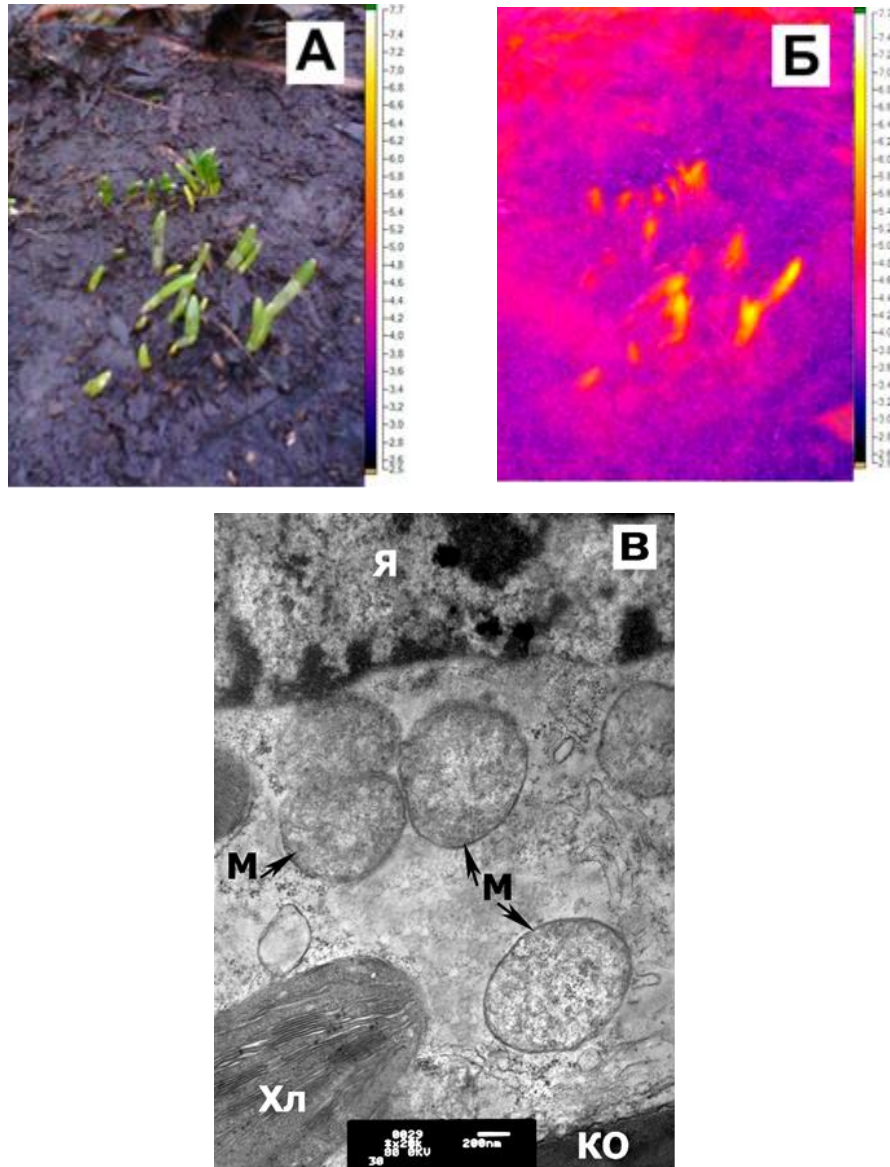


Рис. 4.6. Фотографічне (А) і термографічне (Б) зображення листків та електронно-мікроскопічне (В) зображення мітохондрій (масштаб 200 nm) листків на початку росту листків *G. nivalis* за температури ґрунту +4,03 °С.

Поява незначного видовження мітохондрій і розвинутих крист наприкінці етапу появи листків з ґрунту вказує на їх готовність до інтенсивного продукування АТФ на наступному етапі розвитку.

Вплив температури поверхневого шару ґрунту протягом етапу бутонізації найбільше проявився при середніх значеннях  $+5,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , коли температура листків перевищувала температуру ґрунту у 1,7 рази (рис. 4.7 А, Б).

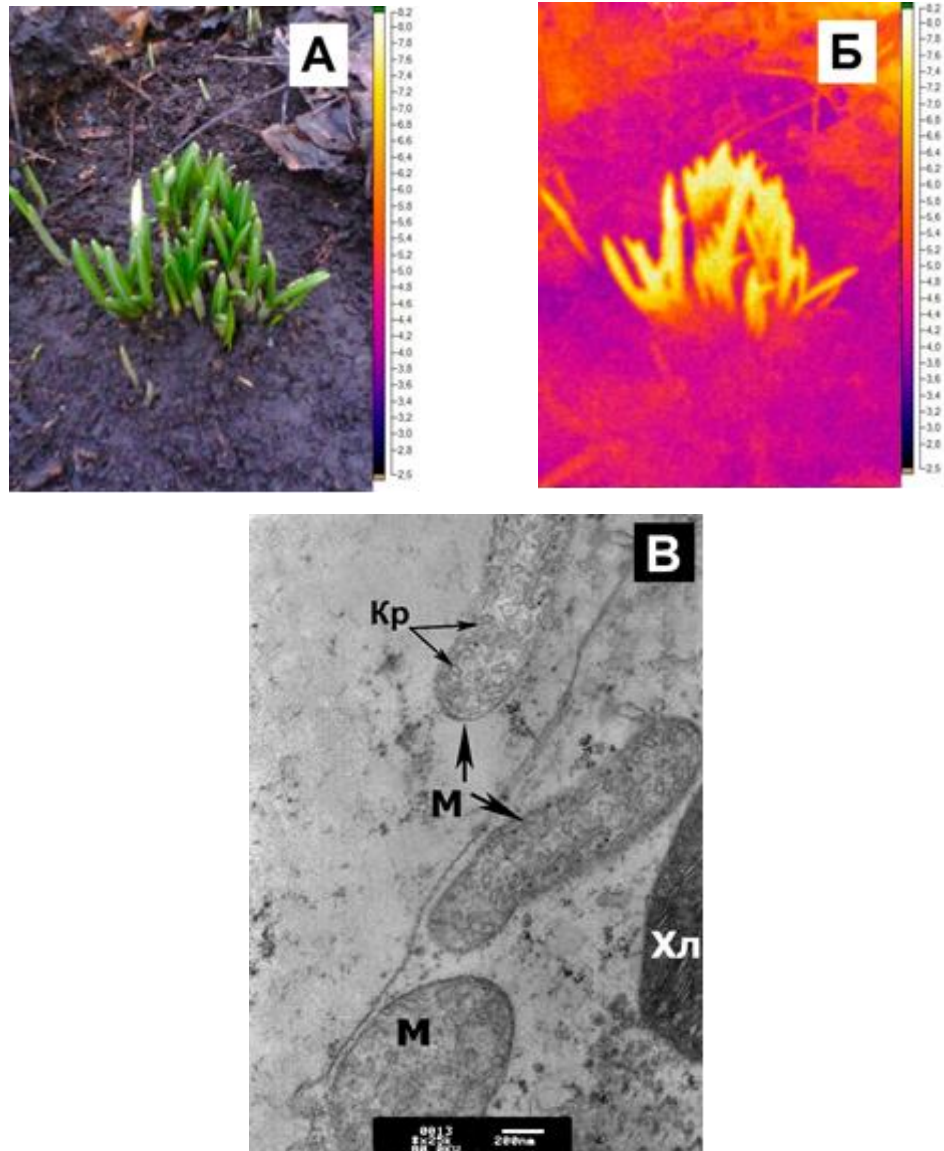


Рис. 4.7. Фотографічне (А) і термографічне (Б) зображення листків та електронно-мікроскопічне (В) зображення мітохондрій (масштаб 200 nm) листків на початку бутонізації рослин *G. nivalis* за температури ґрунту  $+5,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

На початку етапу бутонізації на зрізах клітин мезофілу більшість мітохондрій зберігали видовжену форму (рис. 4.7 В), тобто перебували в активному функціональному стані. Наприкінці етапу бутонізації форма більшості мітохондрій змінилась на округлу, що може вказувати на перехід



мітохондрій в неактивний функціональний стан і відповідне зменшення інтенсивності продукування АТФ, порівняно з вегетативним етапом внаслідок відсутності впливу низьких мінусових температур. При цьому, у мітохондрій не було виявлено ознак впливу стресових умов та пошкоджень крист.

На етапі квітнення рослин *G. nivalis*, порівняно з етапом бутонізації, тобто протягом березня і квітня, при переважанні середньодобової температури атмосферного повітря  $+8,9\text{ }^{\circ}\text{C}$  та температури ґрунту  $+11,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , температура листків була нижчою порівняно з квітками (рис. 4.8 А, Б), при цьому мітохондрії були більш округлі (рис. 4.8 В) порівняно з етапом бутонізації (див. рис. 4.7 В).

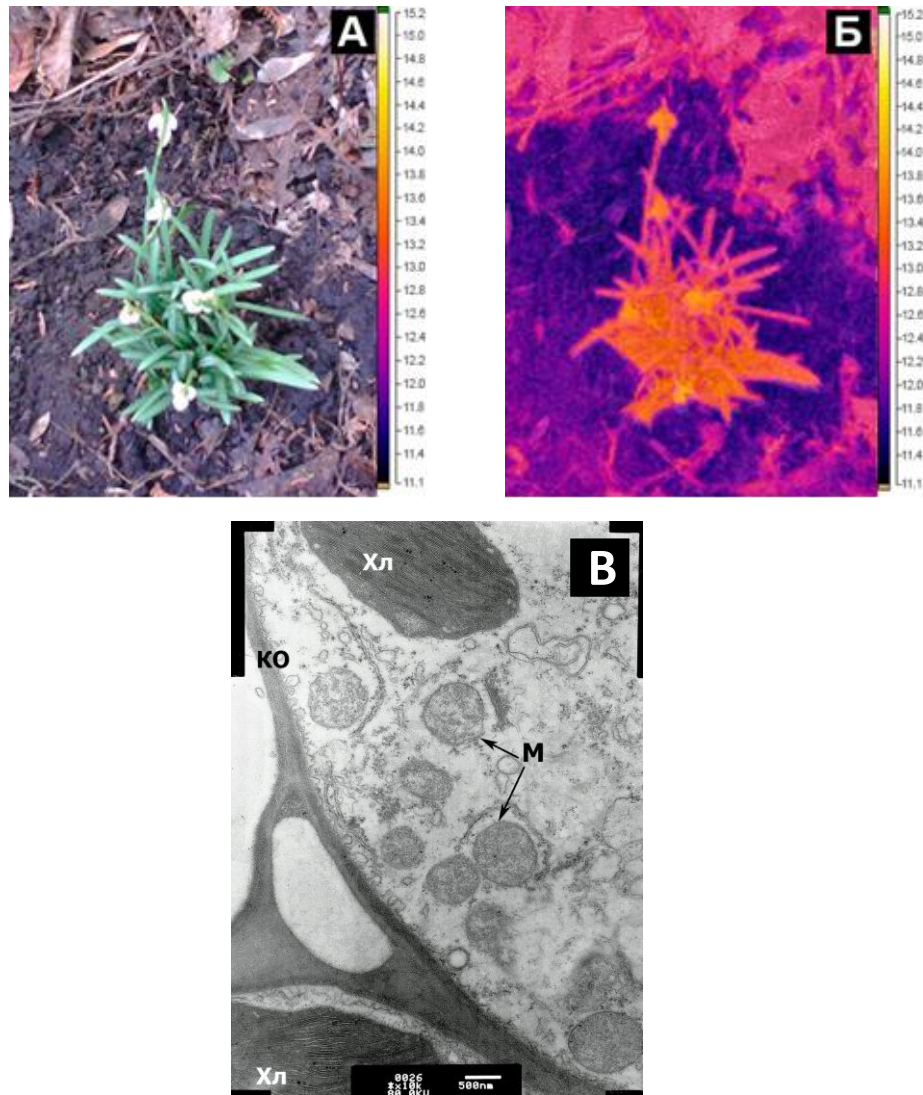


Рис. 4.8. Фотографічне (А) і термографічне (Б) зображення листків та електронно-мікроскопічне (В) зображення мітохондрій (масштаб 500 nm) листків на етапі квітнення рослин *G. nivalis* за температури ґрунту  $+11,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

На зрізах клітин площа крист була меншою, форма мітохондрій була більш округлою і набула ортодоксальну конфігурацію (рис. 4.8) завдяки зменшенню їх довгої осі в середньому на 31,1 %.

Оболонка мітохондрії представлена чіткими контрастними мембранами. В мітохондріальному матриксі середньої щільності видно добре розвинуту систему вільно розташованих крист з помірно широкими інтракристними проміжками. Перимітохондріальний простір та порожнина крист світліші порівняно з матриксом органел.

На зрізах мітохондрій здебільшого можна спостерігати електронно-прозорі ділянки, які часто містять фібрили ДНК (мітохондріальні нуклеоїди) та мітохондріальні рибосоми. Інтрамітохондріальні гранули, які в основному складаються з солей кальцію та деяких інших іонів, досить рідко зустрічаються в органелах. Структура мітохондрій мезофілу листків на цьому етапі розвитку рослин *G. nivalis*, очевидно, вказує на уповільнення продукування АТФ.

Аналіз морфометричних показників мітохондрій та їх крист у *G. nivalis*, відображених у таблицях 4.1 та 4.2, показав, що на етапі до квітнення ефемероїда структурні характеристики мітохондрій і крист є вищими порівняно з етапом квітнення. Це вказує на готовність мітохондрій до високої функціональної активності за умов впливу температур зовнішнього середовища менш сприятливих для розвитку на вегетативному етапі.

Таблиця 4.1

**Морфометричні показники мітохондрій листків *G. nivalis* за низьких температур у весняний період розвитку**

Етап розвитку	Розміри мітохондрії на зрізі клітини				Відношення суми площ крист до суми площ мітохондрій, %
	Довжина, (мкм)	Ширина, (мкм)	Площа, (мкм <sup>2</sup> )	Об'єм, (мкм <sup>3</sup> )	
До квітнення	0,91 ±0,04	0,59 ±0,02	1,49 ±0,02	0,17 ±0,016	60,0±3,0
Під час квітнення	0,63 ±0,05	0,40 ±0,03	0,71 ±0,02	0,05 ±0,003	30,0±2,0

Таблиця 4.2

**Морфометричні показники крист мітохондрій листків *G. nivalis* за низьких температур у весняний період розвитку**

Етап розвитку	Розміри кристи мітохондрії на зрізі клітини				Відношення суми об'ємів крист до суми об'ємів мітохондрій, %
	Довжина, (мкм)	Ширина, (мкм)	Площа, (мкм <sup>2</sup> )	Об'єм, $\times 10^{-5}$ (мкм <sup>3</sup> )	
До квітнення	0,22 $\pm 0,02$	0,03 $\pm 0,002$	0,02 $\pm 0,001$	12,00 $\pm 0,018$	8,0 $\pm 0,1$
Під час квітнення	0,07 $\pm 0,005$	0,009 $\pm 0,0008$	0,0016 $\pm 0,004$	0,30 $\pm 0,011$	1,0 $\pm 0,1$

На етапі квітнення, порівняно з вегетативним етапом, розміри мітохондрій в листках, зокрема їх довжина та ширина, зменшувалися відповідно в середньому на 30,8 та 32,2 %, площа зрізу – на 52,3 %, об'єм – на 70,6 %; а показник відношення суми площі крист до площі мітохондрій зменшувався на 50,0 % (при  $p \leq 0,5$ ) (див. табл. 4.1). Ці дані вказують на те, що потреби в АТФ у листків, очевидно, зменшувались, тоді як у квіток вони навпаки зростали. На цьому етапі розвитку *G. nivalis* морфометричні показники крист, зокрема їх довжина, зменшувалась на 68,2 %, ширина – на 70,0 %, площа зрізу – на 92,0 %, об'єм крист – на 97,5 %, а показник відношення суми об'єму крист до об'єму мітохондрій зменшувався на 87,5 % (при  $p \leq 0,05$ ) (див. табл. 4.2). Результати аналізу морфометричних даних, отриманих на кристах також свідчать про зниження активності мітохондрій листків на етапі квітнення рослин *G. nivalis*.

На основі обчисленого значення індексу пластичності показників ультраструктури мітохондрій листків *G. nivalis*, виявлено що найбільша варіабельність була притаманна об'єму мітохондрій і найменша – ширині мітохондрій на обох етапах розвитку рослин (рис. 4.9), а також площі крист на вегетативному етапі (рис. 4.10). Варто зазначити, що показники індексу

пластичності під час квітнення переважали ті ж параметри на вегетативному етапі.

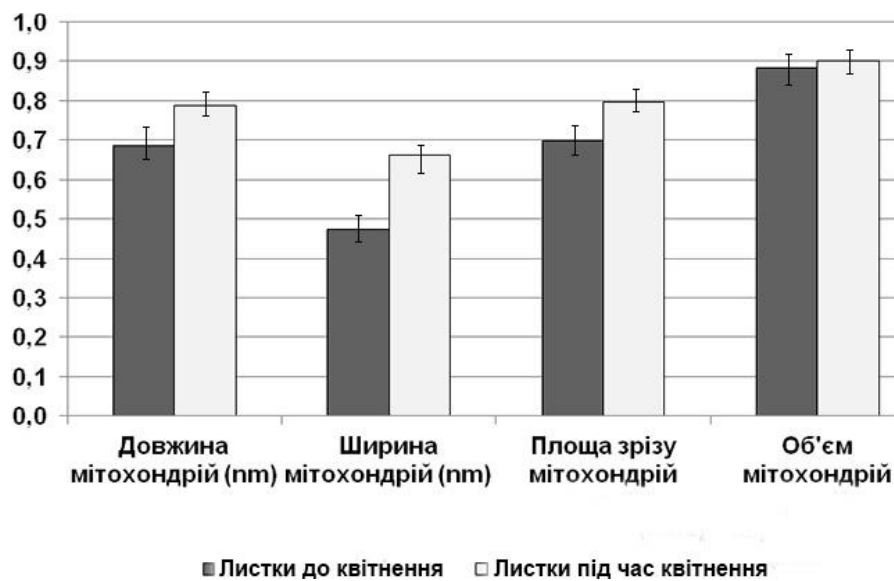


Рис. 4.9. Індекси фенотипічної пластичності розмірів мітохондрій листків *G. nivalis*.

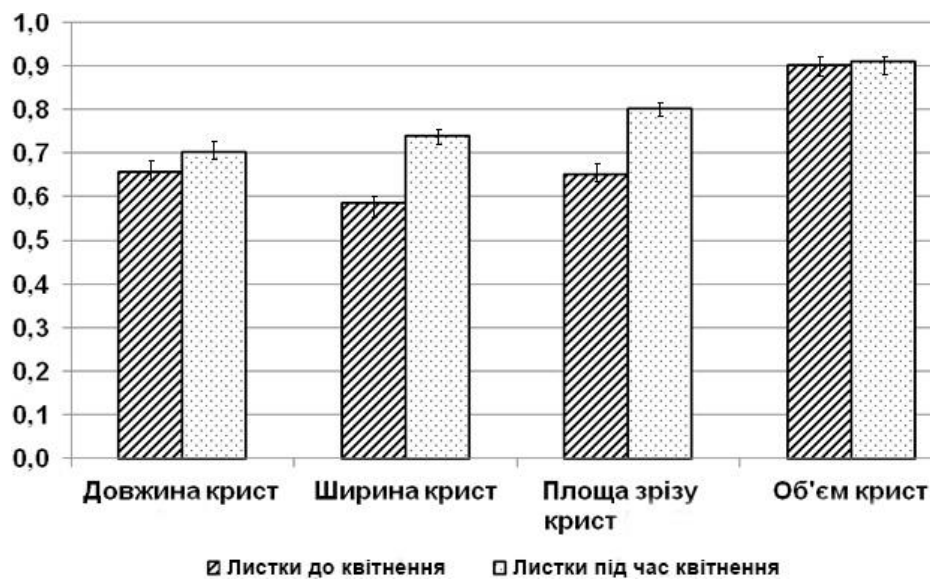


Рис. 4.10. Індекси фенотипічної пластичності розмірів крист мітохондрій листків *G. nivalis*.

Середнє значення індексу фенотипічної пластичності усіх вимірюваних показників на вегетативному етапі розвитку *G. nivalis* становило 0,67, а під час квітнення – 0,77 ( $p < 0,05$ ) [238].

У більшості наукових праць, присвячених дослідженню холодостійкості ефемероїдних рослин, успішність адаптації до впливу низьких температур пов'язують, переважно, з морфологічними, анатомічними [252, 257, 276–278] і фізіологічними [279, 280] особливостями їх клітин. При цьому, розкриттю адаптивних властивостей ультраструктурних змін мітохондрій *G. nivalis* було приділено недостатньо уваги. Серед проаналізованих нами наукових праць тільки в одній виявлено дуже стислий опис загальної структури клітин і лише на одному етапі розвитку листків *G. nivalis* [252].

Раніше повідомлялось, що у рослин, чутливих до впливу низьких температур, через кілька годин після впливу низьких температур можуть виникати не тільки інвагінації мембран ядра і хлоропластів, але й видовження крист та набрякання мітохондрій [281]. У листків озимої суріпиці (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) вплив низьких температур спричинював набрякання мітохондрій і зникнення у них системи крист [282]. Подібна реакція на вплив мінусових температур проявлялась і у різущки (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh, cv. Columbia) [283], але при температурі +5 °C у цього ж виду рослин інші автори спостерігали зменшення об'єму мітохондрій [284]. Зміни морфології мітохондрій з перебудовою крист, які відбувалися в різні періоди розвитку і дихальної активності у *Sauromatum guttatum* [153], могли спричинюватися змінами конформаційного стану їх мембран [285]. Йошінага і співавтори зазначають, що морфологічні зміни в мітохондріях є одним з ранніх проявів впливу окислювального стресу [286]. Механізми, які регулюють зміни морфології мітохондрій, залишаються недостатньо вивченими, проте вже відомо, що будь-які зміни форми мітохондрій можуть суттєво впливати на функціональні властивості цих органел і навпаки [287].

Отримані нами дані про морфологію мітохондрій листків *G. nivalis* свідчать про високий рівень варіабельності різних параметрів, що можна розглядати як адаптивну стратегію, яка спрямована на збереження листків в ранньовесняний період за низької температури та високих рівнів сонячної радіації.



Достатньо високою виявилася також ймовірність існування зв'язку між температурою поверхневого шару ґрунту і температурою листків *G. nivalis* в природних умовах. Зокрема, в загальній вибірці даних на стадіях появи листків з ґрунту та бутонізації такий зв'язок був прямим з відповідними коефіцієнтами кореляції ( $r$ ) 0,88 та 0,73 при  $p < 0,05$ , тоді як на стадії квітнення цей зв'язок виявився зворотним з коефіцієнтом  $-0,86$  при  $p < 0,05$  [288].

#### **4.2. Зміни інтенсивності дихання на різних етапах розвитку**

Відомо, що дихання у рослин забезпечує енергією процеси біосинтезу, а його баланс з фотосинтезом визначає швидкість накопичення біомаси [289]. За несприятливих для ефективного розвитку рослин умов, коли показники факторів оточуючого середовища, зокрема, температури і вологості атмосферного повітря [290], перевищують оптимум, може відбуватися пригнічення дихального метаболізму мітохондрій, зниження його ефективності, часткове інгібування окиснювального фосфорилування [291–293], а також уповільнення росту проростків [294, 295]. Низькі температури повітря (нижче  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) спричинювали виникнення окиснювального стресу, який призводив до порушень обміну речовин та кінетики окремих ферментативних реакцій у тропічних і субтропічних рослин, що, в кінцевому результаті зумовлювало припинення їх дихання та відмирання рослин [296]. На існування зв'язку між інтенсивністю дихання рослин і температурою та вологістю середовища вказують численні факти. Зокрема, повідомлялось, що після впливу низьких температур, в кореневій меристемі відбуваються структурні зміни, які зумовлюють уповільнення поглинання речовин [297]. При цьому в пошкоджених надмірним охолодженням листках також може знижуватись інтенсивність фотосинтезу [298, 299] і активність певних ферментів [300], тоді як вплив низької відносної вологості середовища спричинює уповільнення росту рослин [301]. На відміну від теплолюбних холодостійкі види трав'янистих рослин протягом еволюції набули здатності зберігати необхідну для розвитку інтенсивність дихання та активність життєвих процесів навіть за

мінусових температур середовища. На це вказують численні результати досліджень культурних трав'янистих рослин, зокрема, озимої пшениці, жита, ячменю [193, 302, 303]. Зважаючи на те, що холодостійкі рослини в природних умовах здатні по-різному реагувати на вплив абіотичних факторів, погляди вчених стосовно адаптивних реакцій рослин на вплив низьких температур залишаються неоднозначними. Завдяки дослідженням цитохромного шляху дихання та оксидаз, які виконують термінальну роль, розкрито не тільки наявність у рослинних клітинах ціанід-резистентного (альтернативного) транспорту електронів, але й можливість його активування за умов надмірного пригнічуючого впливу абіотичних факторів [304, 305]. Оскільки ціанід-резистентний шлях транспортування електронів активується після насичення або часткового блокування цитохромоксидазного, оцінка частки ціанід-резистентного дихання відносно інтенсивності загального дихання після впливу ціаніду може бути дещо завищеною, проте, показовою для визначення правомірності припущення про зміни обсягів альтернативного шляху дихання.

Ми припускали, що у листках *G. nivalis* під час ранньовесняного розвитку спричинені низькими температурами ультраструктурні зміни мітохондрій можуть бути результатом модифікацій у мітохондріальному диханні, які пов'язані з механізмами адаптації до низьких температур.

Результати дослідження зв'язку між температурою, вологістю повітря й мітохондріальним диханням листків *G. nivalis* показали, що протягом весняного періоду розвитку інтенсивність загального мітохондріального дихання становила в середньому  $9,78 \pm 0,35$  мкмоль  $O_2$  / (г • год), а ціанід-резистентного –  $21,55 \pm 2,57$  % від загального [241]. Таке значення частки ціанід-резистентного дихання було відносно невисоким, проте воно є близьким до рівня дихання, притаманного листкам багатьох видів рослин, хоча для листків деяких видів рослин характерні показники і понад 50 % [290, 306].

Мінімальне середнє значення інтенсивності загального дихання  $7,68 \pm 0,24$  мкмоль  $O_2$  / (г • год) зафіксовано на початку вегетативного етапу при показниках вологості 59 % і температури  $-3,6$  °C (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Середні значення температури, вологості повітряного середовища та показників мітохондріального дихання листків *G. nivalis* у весняний період розвитку**

<b>Етапи розвитку</b>	<b>Групи вимірів</b>	<b>Температура повітря, °С</b>	<b>Відносна вологість повітря, %</b>	<b>Інтенсивність загального мітохондріального дихання, мкмоль / (г · год)</b>	<b>Частка ціанід-резистентного дихання, %</b>
Поява листків з ґрунту	1	-3,7	76	9,11 ± 0,46	20,34 ± 3,84
Вегетативний	2	-3,6	59	7,68 ± 0,24	39,64 ± 3,30
	3	+2,2	88	12,30 ± 1,20	24,30 ± 2,70
Бутонізація	4	+3,1	72	11,91 ± 0,99	27,85 ± 1,58
	5	+8,5	49	8,04 ± 0,70	19,40 ± 1,46
Квітнення	6	+4,9	74	10,91 ± 0,70	21,87 ± 6,93

Максимальна інтенсивність загального дихання  $12,30 \pm 1,20$  мкмоль  $O_2$  / (г · год) була виявлена на прикінцевій стадії вегетативного етапу при найвищому значенні відносної вологості за весь період експерименту (88 %) та середній температурі  $+2,2$  °С. Варто зазначити, що коефіцієнт кореляції інтенсивності дихання з температурою повітря був низьким і становив 0,22, що вказує на слабкий зв'язок загального дихання з температурою навколишнього середовища. При цьому порівняно із загальним диханням інтенсивність альтернативного дихання була більшою на 97,6%, що спричинене необхідністю енергетичного забезпечення певного рівня метаболізму на фоні зменшення інтенсивності всіх біохімічних реакцій в рослинному організмі.

Найбільше та найменше значення частки ціанід-резистентного дихання (відповідно на вегетативному етапі та бутонізації) виявлені при найменших значеннях показників інтенсивності дихання та вологості повітря (див. табл. 4.3). Отримані на цих етапах дані суттєво відрізнялися за значеннями температури повітря (відповідно  $-3,63$  та  $+8,5$  °С). Зважаючи на це,

очевидно, що саме мінусова температура на вегетативному етапі спричиняла зростання частки ціанід-резистентного дихання. Кореляція між значеннями температури повітря та часткою ціанід-резистентного дихання становила  $-0,54$ , що є показником середньої зворотної кореляції (при  $p \leq 0,1$ ). Цей коефіцієнт кореляції визначає необхідність активації ціанід-резистентного дихання мітохондрій у процесі їх пристосування до впливу низьких температур.

Серед графіків, які відображають зміни в часі вологості, інтенсивності дихання, температури та частки ціанід-резистентного дихання (рис. 4.11), привертає на себе увагу подібність динаміки показників вологості повітря (рис. 4.11 А) та інтенсивності дихання листків (рис. 4.11 Б).

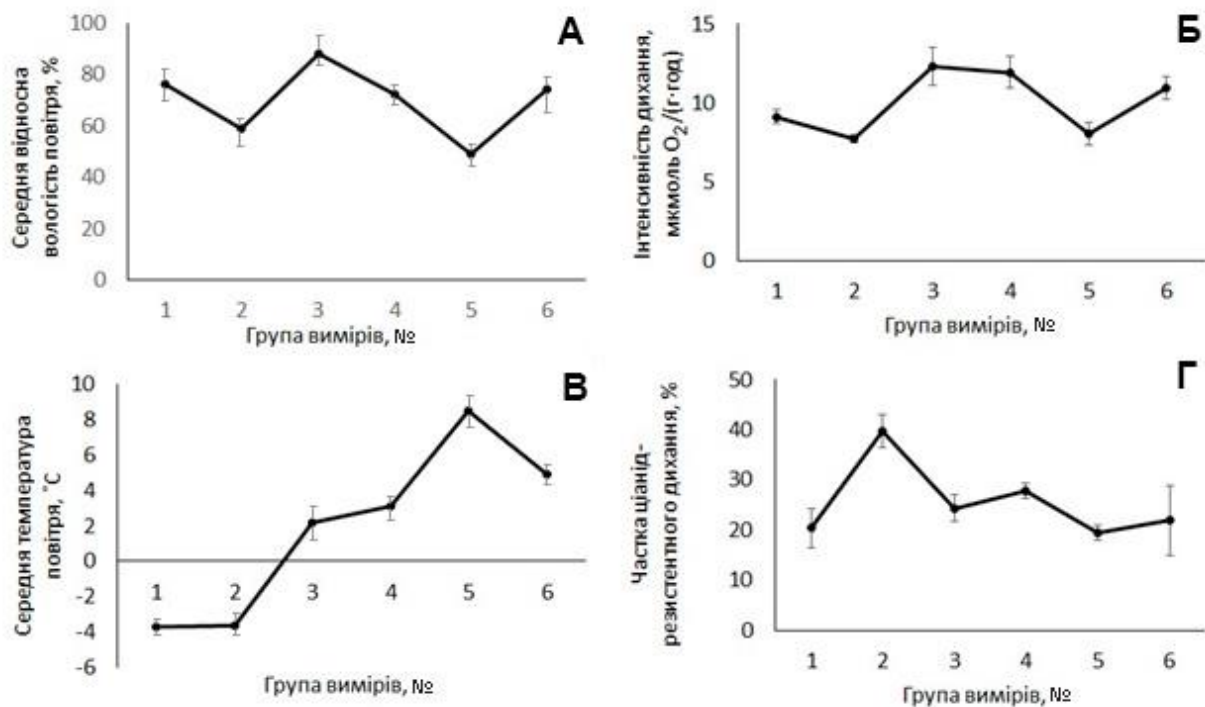


Рис. 4.11. Зміни вологості (А), інтенсивності дихання (Б), температури повітря (В) та частки ціанід-резистентного дихання (Г) протягом весняного розвитку *G. nivalis* (див. табл. 4.3) у групах вимірів: 1 – поява листків з ґрунту, 2, 3 – рання і пізня стадії вегетативного етапу, 4, 5 – бутонізація, 6 – квітнення.

Залежність інтенсивності дихання від вологості повітря підтверджена коефіцієнтом високої прямої кореляції  $r = +0,80$  (при  $p \leq 0,05$ ). На фоні

зростання значень температури повітря (рис. 4.11 В) і загального дихання (див. рис. 4.11 Б), помітна тенденція зниження з часом частки ціанід-резистентного дихання (рис. 4.11 Г). При цьому, даний показник варіював у широких межах і збільшувався на вегетативному етапі розвитку, порівняно з мінімальним значенням наприкінці етапу бутонізації, що вказує на важливу пристосувальну роль альтернативного шляху дихання у метаболізмі листків *G. nivalis*.

Отже, дослідження показали, що вплив основних абіотичних факторів в період ранньовесняного розвитку листків *G. nivalis* може зумовлювати функціональні та кількісні зміни в структурі мітохондрій. В природних умовах ранньовесняного розвитку *G. nivalis* за низьких температур під час активного росту листків порівняно з періодом появи листків на поверхні ґрунту площа зрізу крист і об'єм крист збільшувались, що вказує на їх активний функціональний стан. Вплив плюсових температур проявлявся в укороченні довгої осі мітохондрій і збільшенні кількості органел за рахунок їх активного поділу, що спрямовано на підтримання їх функціональної активності. Починаючи зі стадії бутонізації і впродовж квітнення, коли ріст листків уповільнювався, відбувалося різке зниження усіх кількісних показників структури мітохондрій. Перебіг структурних перетворень серед популяції мітохондрій в загальних рисах відповідав змінам інтенсивності загального і альтернативного дихання. При цьому встановлено, що альтернативне дихання має зворотну залежність від температури атмосферного повітря. Виявлені закономірності загального та ціанід-резистентного дихання викликали припущення, що вони пов'язані з необхідністю активування метаболічних процесів в клітинах листків, зокрема, фотосинтезу за низьких температур. Результати дослідження структурно-функціональних змін хлоропластів та їх ролі у забезпеченні фотосинтезу за низьких температур викладено у наступному розділі.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 4, були опубліковані у статтях: Федюк ОМ, Білявська НО (2015) Ультраструктурні зміни

мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. при вегетації за умов гіпотермії. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(35): 58-63.

Федюк ОМ, Поліщук ОВ, Білявська НО (2016) Динаміка змін інтенсивності дихання листків *Galanthus nivalis* (*Amaryllidaceae*) за різних значень низької температури і вологості повітря. Укр бот журн 73(3): 283-289. [doi.org/10.15407/ukrbotj73.03.283](https://doi.org/10.15407/ukrbotj73.03.283).

Fediuk OM, Bilyavska NO, Zolotareva EK (2018) Effects of soil early-spring temperature on the morphometric parameters of mitochondria in *Galanthus nivalis* L. leaves. Plant Science Today 5(4): 149-154. [dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.4.405](https://dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.4.405)

## РОЗДІЛ 5

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ХЛОРОПЛАСТІВ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ

У розділі наведено дані про зміни ультраструктури хлоропластів та фотохімічних показників фотосинтетичного апарату рослин *G. nivalis* за низьких температур та різної щільності потоку фотонів на різних етапах весняного надземного розвитку в природних умовах.

Дослідження особливостей ультраструктурних змін хлоропластів *G. nivalis*, зумовлених впливом низьких температур атмосферного повітря протягом весняного періоду розвитку ефемероїда, здійснювали за співвідношенням змін показників площі хлоропластів, гран і тилакоїдів мезофілу листків. Вимірювання вказаних показників здійснювали у клітин другого шару мезофілу на адаксіальній стороні листків (рис. 5.1).

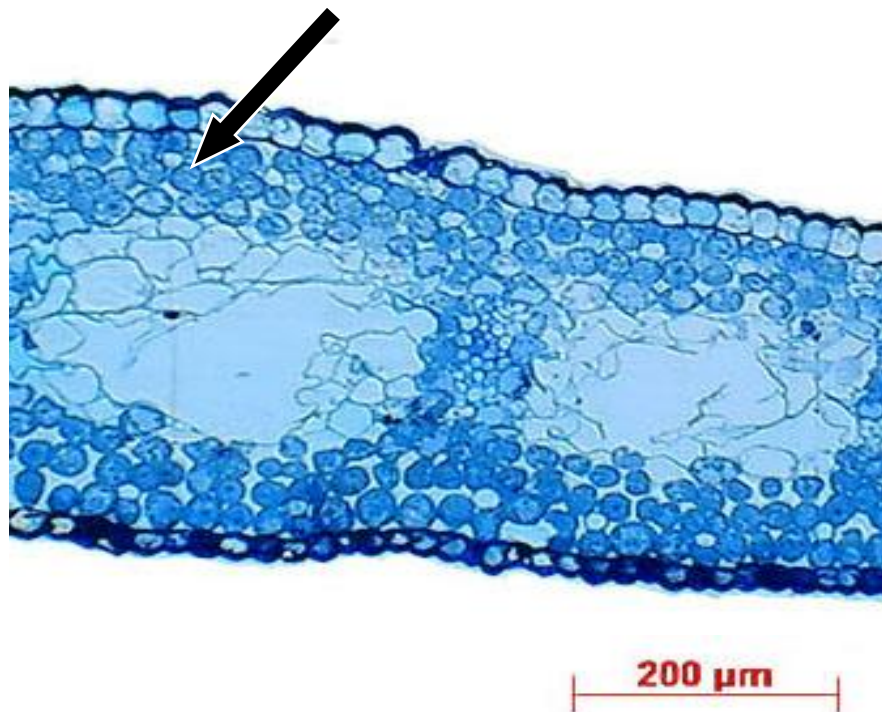


Рис. 5.1. Фрагмент поперечного зрізу листка *G. nivalis*: стрілкою позначено шар клітин, які відбирали для досліджень (світлова мікроскопія).

### 5.1. Ультраструктурні зміни хлоропластів за низьких температур

У природних умовах весняний розвиток *G. nivalis* розпочинався на початку лютого і завершувався наприкінці травня. Дослідження ультраструктурних змін хлоропластів здійснювалось в межах визначених 6 фізіологічних етапів розвитку: 1) поява листків з ґрунту (Gr1) – перші два тижні лютого; 2) ранній вегетативний (Vg1) – 10-11 днів у другій половині лютого, етап розвитку листків; 3) пізній вегетативний етап (Vg2) – 7-8 днів в останній тиждень лютого і на початку березня, який закінчувався з появою бутонів; 4) ранній генеративний (Gn1) – з другого тижня березня до другого тижня квітня, бутонізація й початок квітнення; 5) середній генеративний (Gn2) – з другого тижня квітня до другого тижня травня, етап квітнення; 6) пізній генеративний (Gn3) – протягом другого й третього тижня травня, період завершення квітнення й появи плодів.

На етапі появи листків з ґрунту розвиток хлоропластів здійснювався за умов впливу мінусових середньодобових температур атмосферного повітря від  $-6,8$  до  $-6,5$  °C. Подальший розвиток хлоропластів протягом вегетативного етапу розвитку, тобто до початку квітнення, відбувався в умовах підвищення температури в середньому від  $-6,5$  до  $+4,9$  °C. На етапах квітнення й плодоношення на генеративному етапі розвитку переважали температури повітря в середньому від  $+4,9$  до  $+9,3$  °C. На всіх етапах весняного розвитку середня добова температура повітря не перевищувала  $+10$  °C [307].

За вище вказаних температур атмосферного повітря в природних умовах хлоропласти мезофілу листків *G. nivalis* не зазнавали руйнувань, однак їх форма і розміри відрізнялись (рис. 5.2).

На етапі появи листків на поверхні ґрунту, коли їх довжина становила в середньому 1,5 см, хлоропласти мезофілу мали переважно видовжену форму, іноді з виростами. Поблизу хлоропластів зафіксовано присутність незначної кількості поодиноких округлих мітохондрій, що вказує на підготовку до активного функціонування.



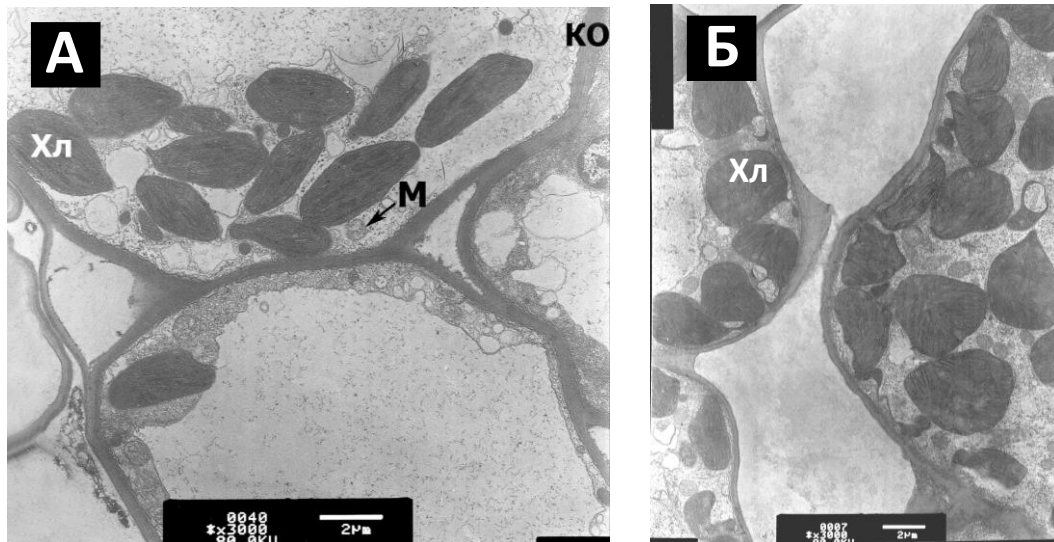


Рис. 5.2. Фрагменти клітин мезофілу листків *G. nivalis* під час появи листків на поверхні ґрунту (А) і бутонізації (Б).

З появою листків на поверхні ґрунту в клітинах мезофілу виявлено наявність контактів між хлоропластами та каналами ендоплазматичного ретикулума, мітохондріями, ядром (рис. 5.3 А).

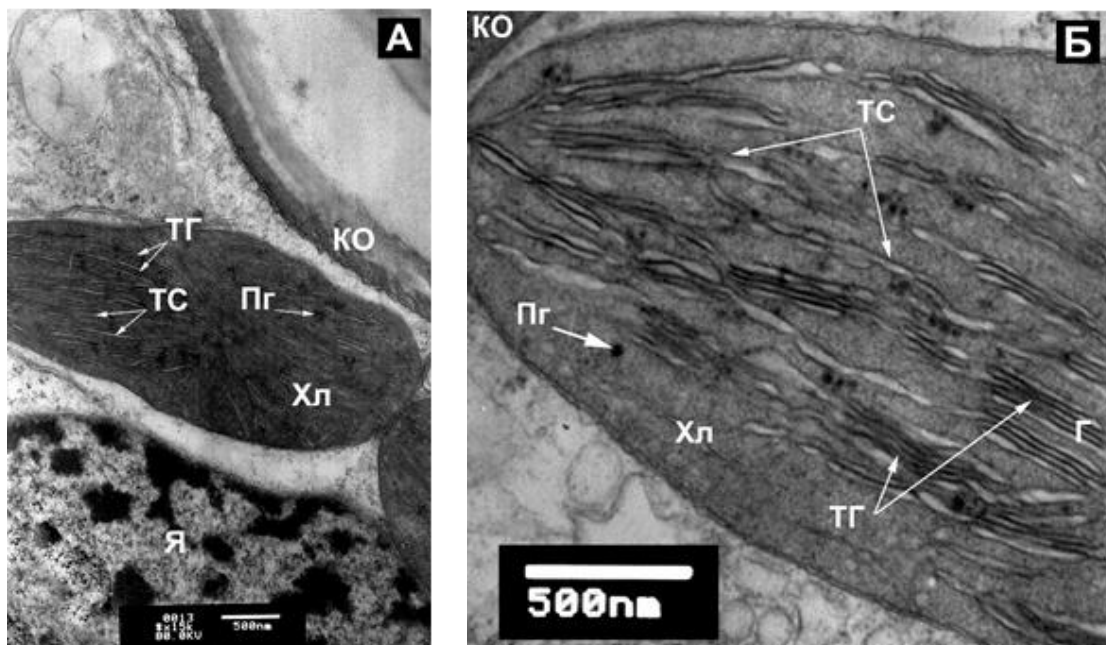


Рис. 5.3. Хлоропласт (А) та його фрагмент (Б) з мезофілу листків *G. nivalis* на етапі появи листків з ґрунту в природних умовах: клітинна оболонка (КО), ядро (Я), хлоропласт (Хл), грана (Г), тилакоїд грани (ТГ), тилакоїди строми (ТС), пластоглобула (Пг).

Після появи листків з ґрунту відбувалось формування складної тилакоїдної системи, подібно ефемероїдам *Scilla siberica* Haw. і *Chionodoxa luciliae* Boiss [308]. Виявлені невисокі грани, локальні набрякання тилакоїдів гран і тилакоїдів стромы, відсутність крохмальних зерен, наявність незначної кількості пластоглобул вказують, що хлоропласти зазнали впливу несприятливих умов, але залишились здатними до функціонування (рис. 5.3 Б). Очевидно, що відсутність крохмалю в стромі хлоропластів рослин *G. nivalis* зумовлена його активною деструкцією, що узгоджується з даними інших авторів щодо зникнення або значного зниження вмісту крохмалю на фоні перебудови ультраструктурної організації пластид впродовж світлової фази фотоперіоду [309].

На вегетативному етапі розвитку *G. nivalis* особливою ознакою хлоропластів мезофілу листків була їх незвичайна амебоїдна форма (рис. 5.4 А).

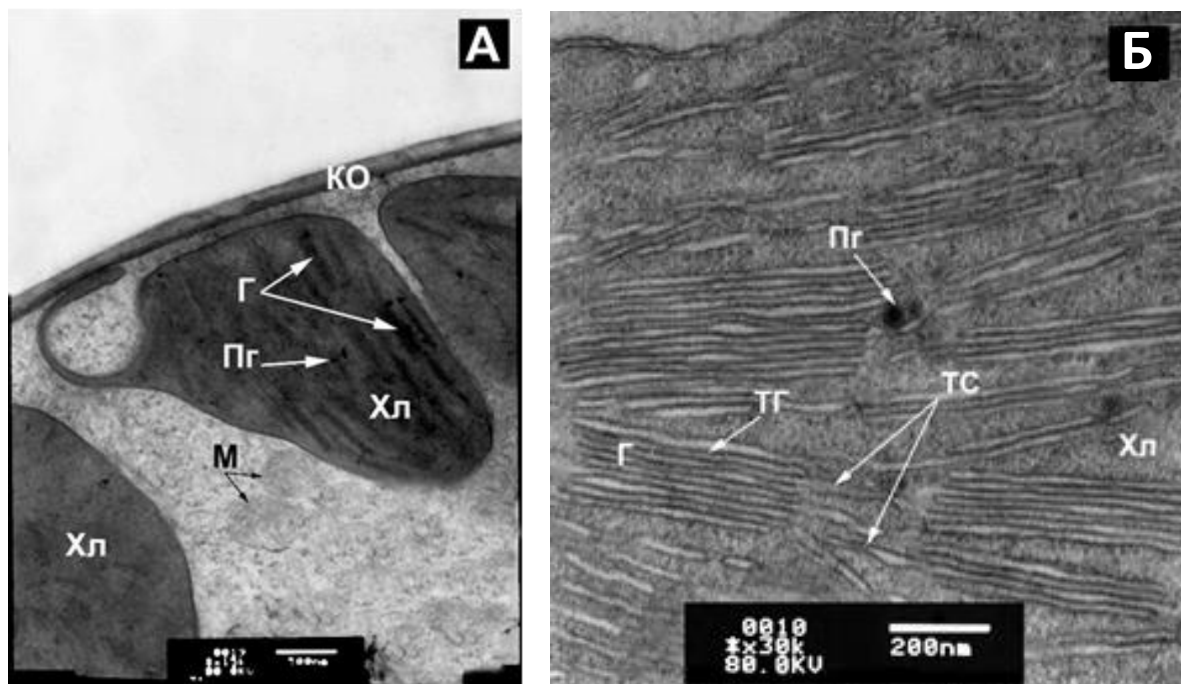


Рис. 5.4. Хлоропласт (А) та його фрагмент (Б) з мезофілу листків *G. nivalis* на вегетативному етапі в природних умовах: клітинна оболонка (КО), мітохондрія (М), хлоропласт (Хл), грана (Г), пластоглобула (Пг).

Хлоропласти з виступаючими виростами зовнішніх мембран (так званими струмулами) раніше виявлені також в клітинах листків та пелюсток у інших представників *Amaryllidaceae* [252].

Амебоїдна форма розглядається як ознака пристосування метаболізму пластид до впливу стресових умов оточуючого середовища [27]. Наявність численних амебоїдних пластид у *G. nivalis* на вегетативному етапі, очевидно, можна пояснити реакцією на низьку температуру. Вважається, що низькі температури сприяють появі якісних і кількісних модифікацій в структурі мембран та призводять до зміни форми пластид [310].

На генеративному етапі розвитку *G. nivalis* хлоропласти листків були переважно еліпсоїдної форми з невисокими гранами. Як видно з рис. 5.5, хлоропласти мали незначне набрякання тилакоїдів гран і тилакоїдів строми, а також у них були відсутні крохмальні зерна.

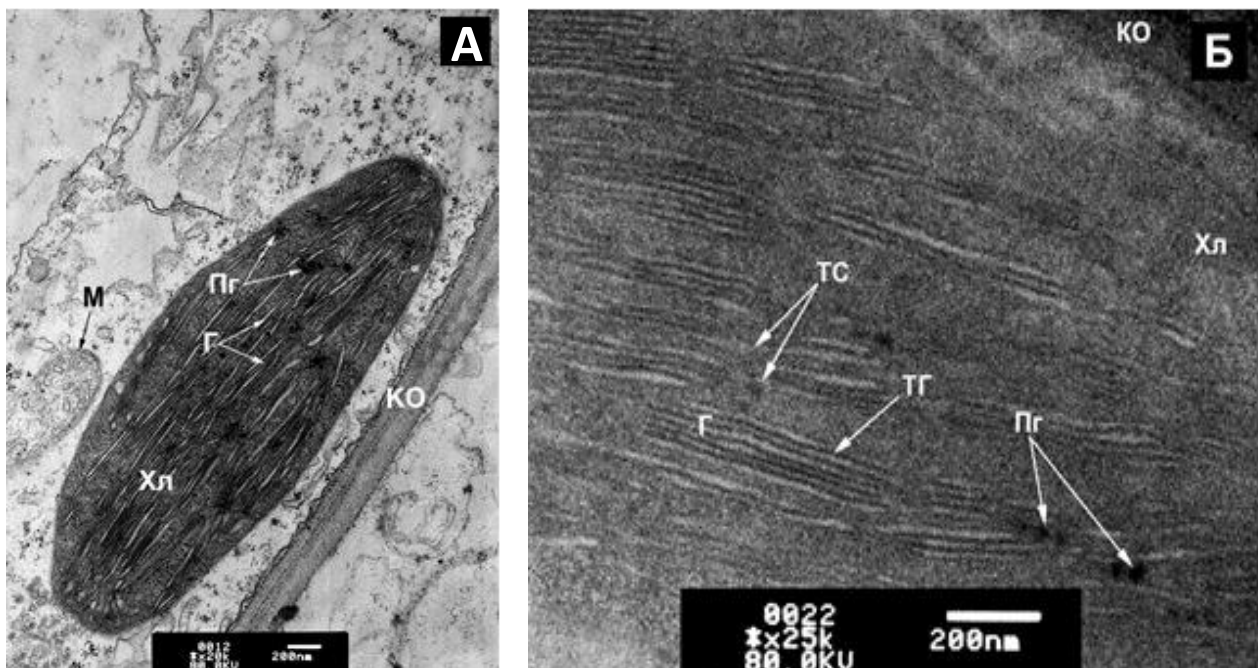


Рис. 5.5. Хлоропласт (А) та його фрагмент (Б) з мезофілу листків *G. nivalis* на генеративному етапі розвитку в природних умовах: клітинна оболонка (КО), хлоропласт (Хл), грана (Г), тилакоїд грани (ТГ), тилакоїди строми (ТС), пластоглобула (Пг).

В результаті аналізу морфометричних показників виявлено, що площа хлоропластів поступово збільшувалась під час появи листків з ґрунту і на вегетативному етапі та досягала максимального значення  $7,7 \text{ мкм}^2$  на пізньому вегетативному етапі розвитку (Vg2). Протягом квітнення й плодоношення, площа хлоропластів зменшувалась до мінімального значення  $5,6 \text{ мкм}^2$  наприкінці пізнього генеративного етапу (Gn3) розвитку (рис. 5.6 А).

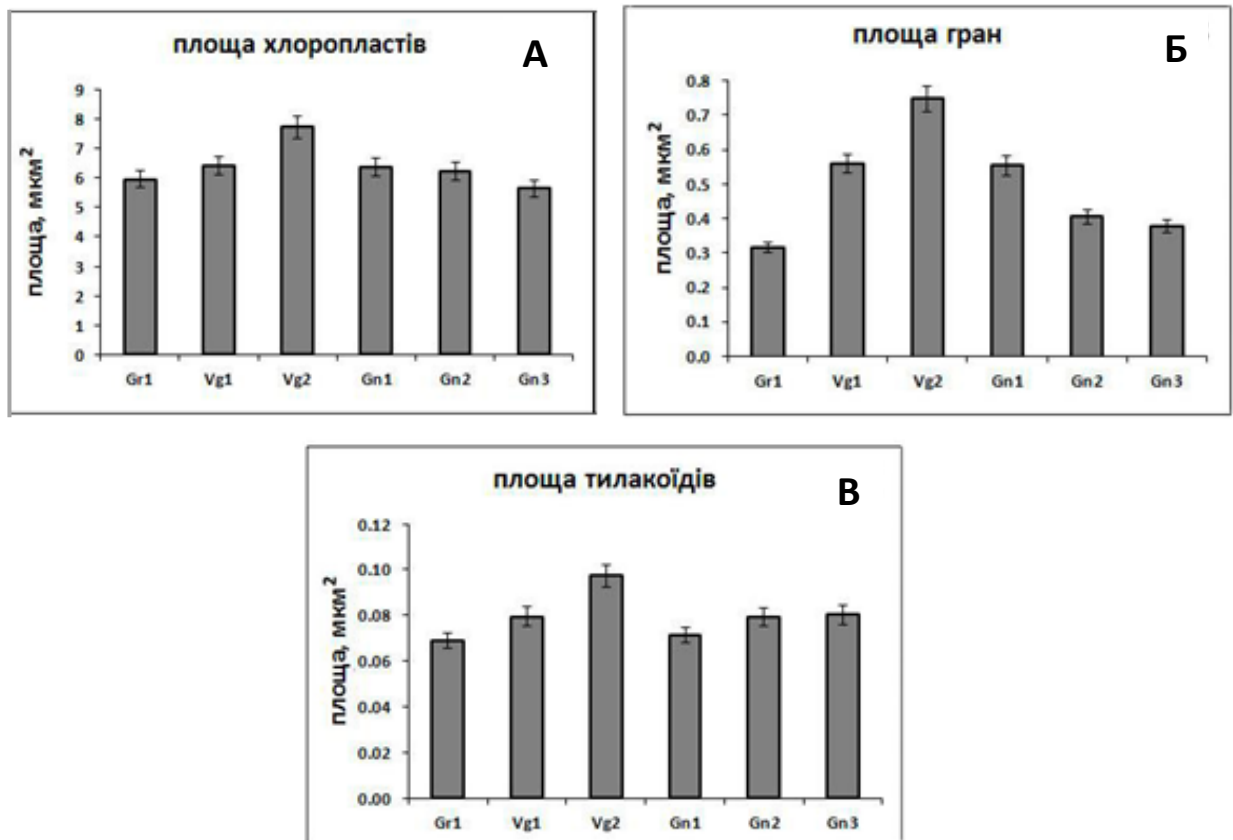


Рис. 5.6. Зміни розмірів площ хлоропластів (А), гран (Б) і тилакоїдів гран (В) в листках *G. nivalis* під час появи листків з ґрунту (Gr), на вегетативному (Vg) і генеративному (Gn) етапах весняного розвитку в природних умовах.

Подібна закономірність зміни розмірів площі простежувалась і у гран, однак була більш виразнішою, порівняно з хлоропластами (рис. 5.6 Б). На початковій стадії етапу появи листків з ґрунту (Gr1) і до пізньої стадії вегетативного етапу розвитку (Vg2), за температури атмосферного повітря від  $-6,8 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $+1,4 \text{ }^\circ\text{C}$ , площа гран збільшувалась вдвічі до максимального

значення  $7,5 \cdot 10^{-1}$  мкм<sup>2</sup>. Протягом генеративного етапу, тобто квітнення й плодоношення, при середніх значеннях температури атмосферного повітря  $+9,3$  °С, площа гран у листках поступово зменшувалась в середньому до  $3,8 \cdot 10^{-1}$  мкм<sup>2</sup> (див. рис. 5.6 Б) [307].

Площа тилакоїдів гран на етапі появи листків з ґрунту була мінімальною і не перевищувала в середньому  $6,9 \cdot 10^{-2}$  мкм<sup>2</sup>. На вегетативному етапі розвитку площа тилакоїдів гран збільшувалась у 1,2 рази порівняно з попереднім періодом появи листків з ґрунту (рис. 5.6 В). При цьому, на пізньому вегетативному етапі (Vg2) грани й тилакоїди строми щільно заповнювали хлоропласти (див. рис. 5.4 Б). На пізньому генеративному етапі (Gn3) за умов активування процесів старіння листків, кількість тилакоїдів у гранах зменшувалась, але їх довжина збільшувалась, що забезпечувало збереження розмірів площі гран. Також зафіксовано збільшення кількості пластоглобул в хлоропластах, що може слугувати підтвердженням процесів деградації мембранних компонентів пластид, які призводять до старіння клітин (рис. 5.5 Б).

У працях деяких авторів [173, 306, 311], присвячених особливостям розвитку ранньовесняних ефемероїдів, зазначається, що вплив низьких температур є необхідною й важливою умовою для здійснення повного весняного циклу розвитку ефемероїдів. Це підтверджено експериментами, проведеними на рослинах проліска. Зокрема, у досліджуваних рослин, переміщених у холодну пору року в оранжерею, структура цибулин значно відрізнялась від контрольних рослин [312]. Збільшення площі хлоропластів і гран в листках на початкових етапах розвитку *G. nivalis*, очевидно, також пов'язане зі змінами температур атмосферного повітря, які за низьких температур активують адаптивні енергетичні процеси в листках.

У хлоропластах теплолюбних рослин за сприятливих температур атмосферного повітря, як правило, спостерігаються непошкоджені дві зовнішні мембрани, значна кількість зерен крохмалю та стовпці гран з численними тилакоїдами гран, які з'єднані між собою тилакоїдами строми [8].

Ультраструктурні пошкодження хлоропластів в клітинах є раннім симптомом впливу низьких температур на листки рослин. Зазвичай, першими проявами впливу низьких температур є набрякання хлоропластів, викривлення й набрякання тилакоїдів, зменшення розміру та кількості крохмальних зерен, а також утворення везикул периферичного ретикулуму з внутрішньої мембрани хлоропласта [313]. Тривале значне охолодження здатне зумовлювати збільшення кількості пластоглобул, ущільнення строми, зникнення гран, розпад оболонки хлоропласта, перемішування вмісту строми з цитоплазмою. Зерна крохмалю можуть з часом поступово зменшуватись, а в рослинах, стійких до охолодження, повністю зникати [8]. Крім цього, може проявлятися дезорієнтація розташування гран відносно одна одної, а також деформація і викривлення гран з подальшим руйнуванням та зникненням тилакоїдів строми [309, 313].

За результатами нашого дослідження, зафіксовані на мікрофотографіях (див. рис. 5.4 Б) невисокі грани, незначне набрякання тилакоїдів гран і тилакоїдів строми, відсутність крохмальних зерен у хлоропластах листків весняного ефемероїда *G. nivalis* протягом етапу появи листків з ґрунту можна вважати особливостями ультраструктури хлоропластів, пов'язаними з впливом низьких температур атмосферного повітря.

Виявлені ультраструктурні зміни хлоропластів у *G. nivalis*, очевидно, відіграють важливу роль в універсальній стратегії адаптації ФСА до впливу низьких температур атмосферного повітря.

## **5.2. Зміни функціональних показників фотосинтетичного апарату за низьких температур**

В даному дослідженні припускалось, що виявлені ультраструктурні зміни хлоропластів в листках *G. nivalis* на різних етапах їх розвитку, ймовірно, пов'язані з фотохімічною активністю хлоропластів і спрямовані на запобігання руйнування ФСП за низьких температур.

Відомо, що фотохімічна активність хлоропластів залежить переважно від стану ФСII – ключового трансмембранного пігмент-білкового комплексу хлоропластів, який забезпечує поглинання і трансформацію світлової енергії, а також відіграє провідну роль у захисті ФСА від фотоінгібування [314].

Застосування методу флуоресценції хлорофілу у адаптованих до темряви листків при активації фотосинтезу різною інтенсивністю світла (40, 80, 150, 350, 700, 1000 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup>) надало можливість оцінити функціональний стан ФСII у листках *G. nivalis*. Визначались максимальний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії в адаптованих до темряви листках *G. nivalis* ( $F_v/F_m$ ); коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу ( $qP$ ), якій є наближеною мірою ступеню окислення первинних акцепторів  $Q_A$ , тобто частки відкритих реакційних центрів ФСII; коефіцієнт нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу  $qN$ , який характеризує теплову дисипацію в комплексах ФСII [315] (табл. 5.1).

Аналіз даних таблиці 5.1 та показників температури повітря (описаних в підрозділі 5.1) показав, що протягом весняного періоду, під час появи листків з ґрунту та на вегетативному етапі розвитку *G. nivalis*, навіть при переважанні низьких плюсових температур атмосферного повітря, ФСА вже був сформованим, залишався непошкодженим і функціонуючим, що підтверджено значеннями показника  $\Phi_{PSII}$ . Функціональні параметри ФСА ефемероїда при низьких плюсових температурах весною були близькими до параметрів теплолюбних рослин, у яких вегетативний етап розвитку припадає на літній період. Цей факт узгоджується з результатами дослідження, проведеного Мамушиною зі співавторами [308], які дійшли висновку, що формування розвиненої тилакоїдної системи у ранньовесняних ефемероїдів *Scilla sibirica* Haw. і *Chionodoxa luciliae* Boiss відбувається вже в перші дні появи листків рослин на поверхні ґрунту.

В результаті вивчення параметрів флуоресценції багатьох видів рослин, було виявлено, що у листків, які не зазнали впливу низьких температур

величина максимального квантового виходу фотохімічного перетворення енергії ( $F_v/F_m$ ) в середньому становить 0,82 [248].

Таблиця 5.1

**Параметри індукції флуоресценції хлорофілу листків *G. nivalis***

Етапи*	ЩПФ, мкмоль · м <sup>-2</sup> · с <sup>-1</sup>	$F_v/F_m$	qP	qN	$\Phi_{PSII}$
Gr	80	0,795±0,010	0,756±0,059	0,110±0,082	0,607±0,031
Vg	40	0,802±0,006	0,867±0,010	0,217±0,025	0,630±0,007
	80	0,779±0,005	0,692±0,002	0,121±0,007	0,589±0,008
	180	0,811±0,007	0,843±0,017	0,112±0,014	0,643±0,007
	350	0,797±0,001	0,702±0,003	0,312±0,004	0,510±0,008
	700	0,801±0,003	0,549±0,013	0,448±0,016	0,367±0,010
Gn	350	0,791±0,004	0,628±0,032	0,345±0,036	0,438±0,023
	700	0,787±0,011	0,439±0,038	0,517±0,038	0,270±0,028
	1000	0,772±0,015	0,269±0,022	0,632±0,029	0,147±0,008

Примітка. \* – етапи весняного розвитку: Gr – поява листків з ґрунту; Vg – вегетативний; Gn – генеративний;  $F_v/F_m$  – максимальний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії в адаптованих до темряви листках; qP – коефіцієнт фотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу; qN – коефіцієнт нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу;  $\Phi_{PSII}$  – ефективний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії ( $M \pm \sigma$ ).

Величина показника  $F_v/F_m$  у листків *G. nivalis* протягом їх розвитку варіювала незначно, тому можна вважати, що ФСА листків не руйнувався за умов впливу низьких температур. Проте, зі збільшенням інтенсивності актинічного світла до 1000 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> величина максимального квантового виходу знижувалась на 5,8%, що є ознакою початку фотоінгібування.

Ефективність роботи ФСII оцінювалась за величиною коефіцієнту фотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу qP, який закономірно зменшувався при підвищенні інтенсивності діючого світла (див. табл. 5.1).



Величина  $qP$  залежить як від надходження електронів до первинного хінонового акцептора  $Q_A$ , так і від їх відтоку до пластохінонового пулу. Збільшення інтенсивності світла зумовлює підвищення ступеня відновлення пулу хінонових акцепторів електронів, при цьому зменшується значення параметра  $qP$  [315, 316].

Світлова енергія, що поглинається ФСЦ, розподіляється між фотосинтетичним перенесенням електронів і нефотохімічними процесами. Нефотохімічне гасіння ( $qN$ ) реєструє перетворення у тепло надлишку енергії, яка не може бути використана при асиміляції  $CO_2$ . Здатність рослини розсіювати надлишок енергії світла відіграє провідну роль у захисті рослин від фотопошкодження. На генеративному етапі розвитку листків *G. nivalis* при збільшенні інтенсивності діючого світла значення показника  $qN$ , тобто дисипації енергії у ФСЦ, зростали і досягали максимуму при ЩПФ 1000  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (див. табл. 5.1).

Згідно з наведеними у таблиці даними, фотохімічні параметри листків *G. nivalis* на вегетативному й генеративному етапах розвитку дещо відрізнялися. Зокрема, при активації фотосинтезу світлом з ЩПФ 350  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  у листків на вегетативному етапі коефіцієнт  $qP$  досягав 0,7, тоді як на генеративному він становив 0,6, тобто знизився на 10,3%. При більшому рівні освітлення (700  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) на генеративному етапі розвитку  $qP$  знижувався вже на 20,2% порівняно з вегетативним етапом. Коефіцієнт нефотохімічного гасіння  $qN$  при інтенсивності освітлення 350  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  у листків на генеративному етапі розвитку перевищував величину  $qN$  на вегетативному етапі на 10,6%, тоді як при 700  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  – на 15,4%. Це вказує на активну трансформацію фотосинтетичного апарату в ході онтогенезу. Порівняно з іншими видами рослин, для яких характерний довготривалий весняно-літній вегетаційний розвиток, у *G. nivalis* рівень нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу-*a* в листах за високих рівнів освітлення був значно нижчим.

Подібну закономірність раніше виявлено іншими дослідниками також і у пустельних ефемероїдів короткотривалого весняного розвитку. Зокрема, зазначається, що у досліджуваних рослин за умов високого рівня освітлення нефотохімічне гасіння залишалось на низькому рівні і корелювало з високою швидкістю електронного транспорту [317].

У нашому дослідженні швидкість електронного транспорту (рис. 5.7) визначали на основі значень флуоресценції хлорофілу з використанням параметру Дженті  $\Phi_{PSII}$  [318] (див. табл. 5.1), який надає можливість оцінити ефективність функціонування ФСА, зокрема величину реального квантового виходу електронного транспорту.

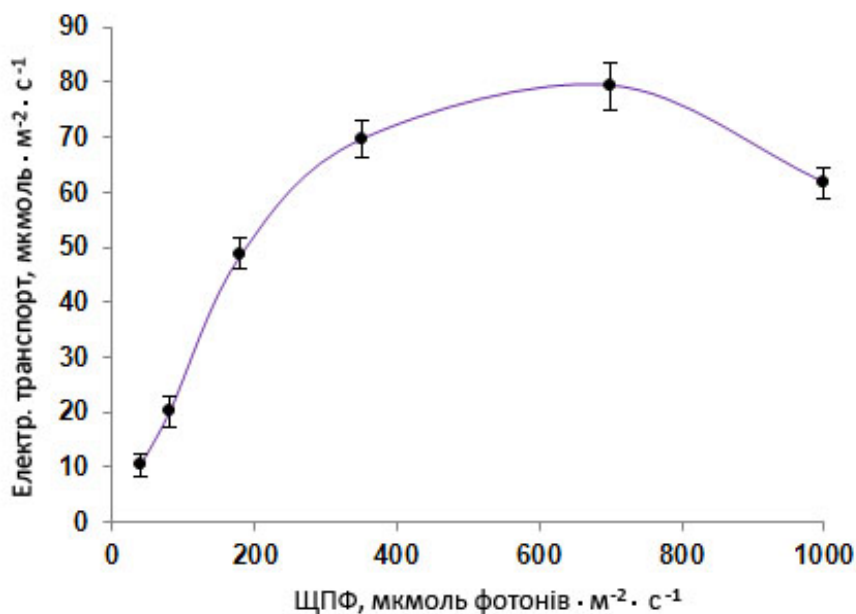


Рис. 5.7. Швидкість перенесення електронів при активації фотосинтезу за умов впливу різної інтенсивності актинічного світла в листках *G. nivalis* (за даними флуоресценції хлорофілу *a*).

За даними, відображеними на рис. 5.7, помітно, що швидкість перенесення електронів підвищувалася при збільшенні ЩПФ до 700 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>, але при подальшому збільшенні інтенсивності освітлення до 1000 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> швидкість електронного транспорту дещо знижувалась, що, ймовірно, пов'язано з початком фотоінгібування.

Отримані в нашому дослідженні значення швидкості електронного транспорту (див. рис. 5.7) вказують на високу фотосинтетичну активність листків *G. nivalis* на ранньовесняних етапах їх розвитку при незначних мінусових та плюсових температурах атмосферного повітря. Зміни фотосинтетичних характеристик листків *G. nivalis* за різних значень інтенсивності діючого світла дуже подібні до параметрів ФСА інших весняних ефемероїдів [308, 317, 319, 320]. Це дає підстави вважати такі зміни характерною адаптивною ознакою ФСА весняних ефемероїдів.

Весняні ефемероїди розглядаються як високопродуктивні рослини на відміну від інших лісових трав з довготривалим розвитком [316, 320, 321]. У природних умовах ранньовесняного розвитку за відносно низьких температур і на прямому сонячному освітленні у ефемероїдів виявлено дуже високий потенціал швидкості фотосинтезу та стійкість до фотоінгібування [308, 317, 319]. Коливання інтенсивності світла протягом вегетативного етапу можуть зумовлювати відповідні адаптивні зміни активності фотосинтетичних процесів [322]. У лісових ценозах крони багаторічних дерев, поглинаючи значну кількість сонячного світла, сприяють тривалішому збереженню снігового покриву на поверхні ґрунту, особливо на північних схилах. Унаслідок нерівномірності поглинання, розсіювання та відбивання сонячних променів кронами дерев і сніговим покривом щільність потоку фотонів, який надходить до поверхні ґрунту, тобто до листків ранньовесняних ефемероїдів, що розміщені на поверхні ґрунту, може значно змінюватись.

З формуванням листків на верхніх ярусах лісової рослинності інтенсивність освітлення рослин нижнього ярусу (трав'янистих видів) знижується, тому, подібно рослинам з тривалим весняно-літнім вегетативним етапом [322], у весняних ефемероїдів виникає необхідність застосування гнучкої стратегії адаптації, в якій зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату впливають на ультраструктуру хлоропластів. Це підтверджується результатами досліджень стану ФСА листків у різні

періоди розвитку рослин [298, 323], а також отриманими нами результатами дослідження листків рослин *G. nivalis*.

Таким чином, дослідження якісних та кількісних особливостей ультраструктури хлоропластів *G. nivalis*, зумовлених впливом низьких температур атмосферного повітря, показало, що при появі листків над поверхнею ґрунту їх хлоропласти мали видовжену форму, іноді з виростами. У безкрохмальних хлоропластах листків були присутні невисокі грани, зафіксовано локальні набрякання тилакоїдів гран і тилакоїдів строми. На вегетативному етапі у *G. nivalis* наявність численних амебоїдної форми пластид зі струмулами, очевидно, можна пояснити реакцією на низьку температуру. Площа зрізу хлоропласта досягала максимального значення на пізньому вегетативному етапі, до початку квітнення ефемероїду. Ще виразніше змінювалася площа зрізу грани. Протягом квітнення й плодоношення площа гран у листках поступово зменшувалася.

Застосування методу флуоресценції хлорофілу у адаптованих до темряви листків при активації фотосинтезу різною щільністю потоку фотонів (40, 80, 150, 350, 700 або 1000 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup>) показало, що протягом весняного періоду під час появи листків та на вегетативному етапі розвитку *G. nivalis*, навіть за низьких плюсових температур атмосферного повітря, фотоиснтетичний апарат вже був сформованим, залишався непошкодженим і функціонуючим, що підтверджується значеннями показника ФПСII.

Фотохімічні параметри листків відрізнялися на вегетативному й генеративному етапах. Зокрема, при активації світлом з ЩПФ 350 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup> у листків на вегетативному етапі коефіцієнт qP був нижчим порівняно з генеративним етапом. Коефіцієнт нефотохімічного гасіння qN при тому ж освітленні у листків на генеративному етапі розвитку перевищував його величину на вегетативному етапі, що вказує на активну трансформацію фотосинтетичного апарату в ході онтогенезу.

Швидкість перенесення електронів підвищувалася зі збільшенням ЩПФ до 700 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup>, але при освітленні у 1000 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup> швидкість

електронного транспорту дещо знижувалася, що, ймовірно, пов'язано з початком фотоінгібування. Отримані в нашому дослідженні параметри швидкості електронного транспорту вказують на високу фотосинтетичну активність листків *G. nivalis* при невисоких мінусових та плюсових температурах атмосферного повітря на вегетативному етапі, що корелює з ультраструктурними змінами хлоропластів.

Отже, показано, що для *G. nivalis* характерна висока активність фотосинтетичного електронного транспорту за низьких рівнів нефотохімічного гасіння флуоресценції, що свідчить про пристосованість фотосинтетичного апарату листків до відносно короткотривалого ранньовесняного розвитку при високій щільності потоку фотонів і низьких плюсових температурах. У весняних ефемероїдів протягом еволюції сформувалась гнучка стратегія адаптації, в якій зміни функціонального стану фотосинтетичного апарату впливають на динамічні перебудови ультраструктури хлоропластів. Це підтверджується результатами досліджень стану ФСА листків у різні етапи розвитку ефемероїда.

Виявлена повна відсутність крохмалю в хлоропластах листків *G. nivalis* викликала припущення, що розчинні цукри, в першу чергу, сахароза, може брати участь в стабілізації структури та функціонування фотосинтетичного апарату листків за низьких температур. Результати дослідження структурно-функціональних змін тилакоїдів, гран і хлоропластів за низьких температур а також кріопротекторних властивостей сахарози і її ролі у загальній стратегії забезпечення стікості фотосинтетичного апарату листків до низьких температур наведено у наступному розділі.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 5, були опубліковані у статті: Федюк ОМ, Білявська НО, Золотарьова ОК (2017) Ультраструктурні особливості та стан фотосинтетичного апарату листків *Galanthus nivalis* L. на весняних етапах онтогенезу. Укр бот журн 74(5): 475-487. [doi.org/10.15407/ukrbotj74.05.475](https://doi.org/10.15407/ukrbotj74.05.475).

## РОЗДІЛ 6

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ХЛОРОПЛАСТІВ, ЩО ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ЕКЗОГЕННОЇ САХАРОЗИ ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Ранньою весною у природних умовах помірного кліматичного поясу переважають низькі температури атмосферного повітря і поверхневого шару ґрунту. Відомо, що в цих умовах хлоропласти рослин здатні виконувати роль сенсорів специфічних сигнальних шляхів регуляції молекулярних і фізіологічних процесів [324], які забезпечують виживання клітин. На основі результатів раніше проведених експериментів, було виявлено, що з підвищенням рівня морозостійкості вищих рослин у них зростає концентрація сахарози (Сах).

На важливості сахарози в адаптації рослин до низьких температур зауважується в працях деяких авторів [325–327], які дійшли висновку, що використання екзогенної сахарози може призвести до підвищення холодостійкості рослин. В результаті проведення подібних експериментів в лабораторних умовах інші автори підтвердили доцільність холодової адаптації клітин рослин до низьких температур і пов'язували її з підвищеним вмістом сахарози в рослинах [219, 328, 329].

У нашому дослідженні розкриття ролі сахарози у забезпеченні підвищення стійкості хлоропластів *Galanthus nivalis* L. до впливу низьких температур здійснювалось методом збагачення листків екзогенною сахарозою [330].

#### **6.1. Ультраструктурні зміни гран хлоропластів, що зазнали впливу екзогенної сахарози за низьких температур**

В умовах експериментального вирощування *G. nivalis* при середній температурі атмосферного повітря +5 °С і появі листків над поверхнею ґрунту в

розвитку хлоропластів листків значні негативні зміни ультраструктури тилакоїдів гран не проявлялись (рис. 6.1).

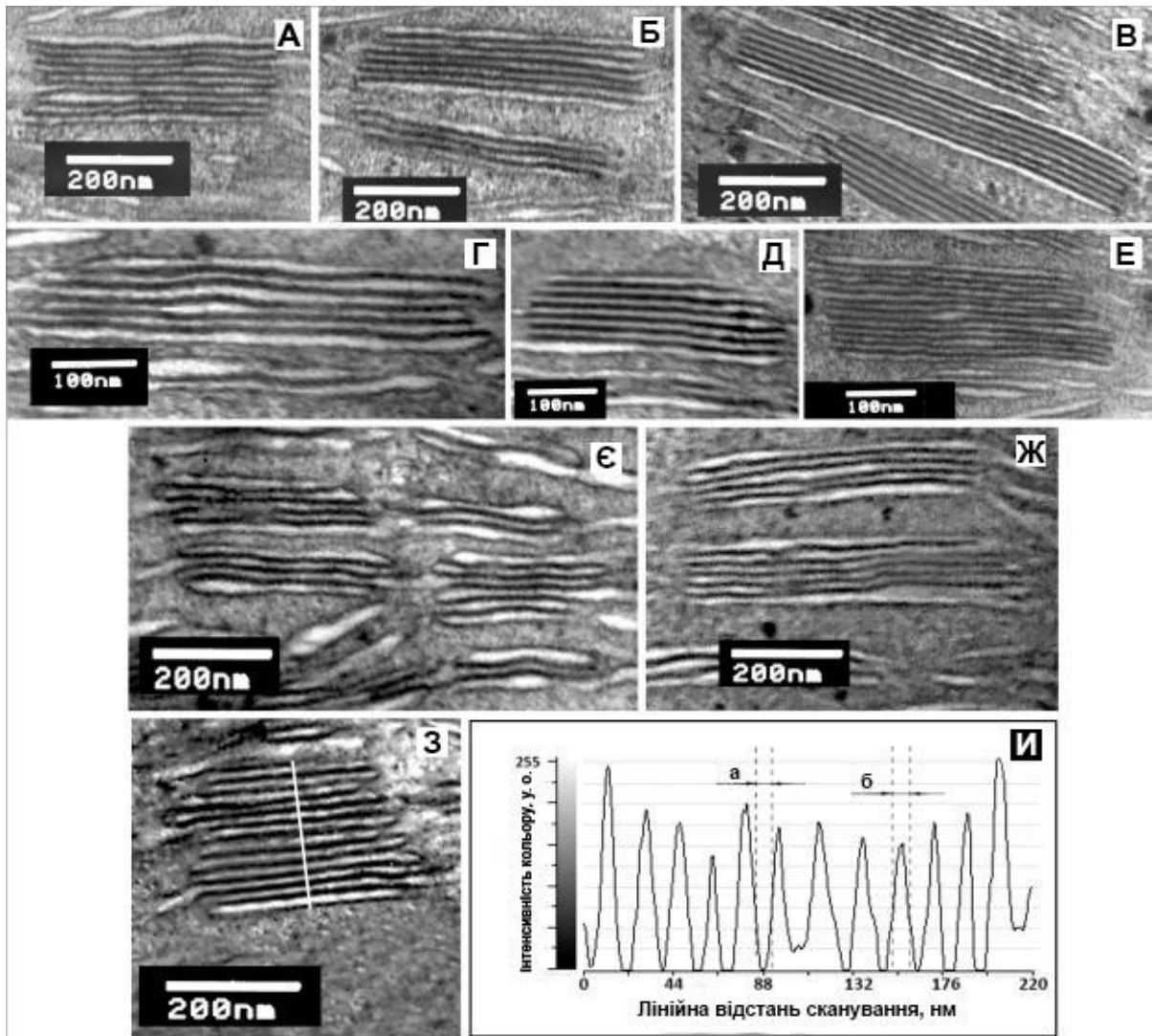


Рис. 6.1. Ультраструктура тилакоїдів гран в хлоропластах листків *G. nivalis*: А – без сахарози (Сах), (Б–В) після 1 год. експозиції при +5 °С, Б – з 0,02 М Сах, В – з 0,1 М Сах; (Г–Е) після 1-год. експозиції при –5 °С, Г – без Сах, Д – з 0,02 М Сах, Е – з 0,1 М сахарозою; (Є) після 1-год. експозиції при –15 °С, Є – без сахарози, Ж – з 0,02 М Сах, З – з 0,1 М Сах; И – гістограма профілю лінійного сканування інтенсивності кольору пікселів, де а – товщина тилакоїда; б – ширина люмену (трансмійна електронна мікроскопія, масштаб А, Б, В, Є, Ж, З – 200 nm, Г, Д, Е – 100 nm).

За цих температурних умов (+5 °C) у загартованих до холоду листків було виявлено в середньому 8 тилакоїдів на грану (табл. 6.1), у яких ширина міжтилакоїдного простору була нерівномірною, тоді як у контрольних листків тилакоїди гран мали ознаки набряків та хвилястості, тому розташовувались в гранах не щільно (рис. 6.1 А, Б).

Таблиця 6.1

**Розміри гран та їх складових у хлоропластах листків *Galanthus nivalis* L. за умов впливу низьких температур та екзогенної сахарози**

T, °C	[Сах], М	Кількість тилакоїдів на грану	Довжина тилакоїду грани, нм	Товщина тилакоїду грани, нм	Ширина люмінального простору, нм	Висота грани, нм	Площа зрізу грани, нм <sup>2</sup>
+5	0	8,1± 0,78 <sup>b</sup>	447,29± 11,23 <sup>c</sup>	6,8± 0,30 <sup>a</sup>	7,3± 0,70 <sup>a</sup>	114,21± 5,78 <sup>b</sup>	51084,99± 302,45 <sup>c</sup>
+5	0,02	6,2± 0,61 <sup>a</sup>	519,23± 14,06 <sup>d</sup>	7,6± 0,62 <sup>ab</sup>	8,1± 0,34 <sup>a</sup>	97,34± 6,13 <sup>a</sup>	50541,85± 591,39 <sup>c</sup>
+5	0,1	6,0± 0,60 <sup>a</sup>	778,00± 10,45	8,3± 0,52 <sup>ab</sup>	8,3± 0,38 <sup>ab</sup>	99,60± 8,09 <sup>ab</sup>	77488,80± 439,75 <sup>f</sup>
-5	0	5,2± 0,51 <sup>a</sup>	542,23± 12,46 <sup>d</sup>	9,0± 0,43 <sup>ab</sup>	9,5± 0,19 <sup>b</sup>	96,23± 3,83 <sup>a</sup>	52162,53± 996,14 <sup>c</sup>
-5	0,02	6,1± 0,60 <sup>a</sup>	361,30± 11,18 <sup>b</sup>	8,7± 0,57 <sup>ab</sup>	9,3± 0,44 <sup>ab</sup>	109,81± 3,34 <sup>b</sup>	39670,74± 517,58 <sup>b</sup>
-5	0,1	11,4± 0,62 <sup>c</sup>	423,11± 10,44 <sup>c</sup>	7,0± 0,22 <sup>a</sup>	9,5± 0,17 <sup>b</sup>	188,18± 2,48 <sup>c</sup>	79586,99± 754,98 <sup>g</sup>
-15	0	5,3± 0,51 <sup>a</sup>	294,32± 8,50 <sup>a</sup>	9,4± 0,11 <sup>b</sup>	10,9± 0,81 <sup>c</sup>	107,59± 5,48 <sup>b</sup>	31665,89± 908,55 <sup>a</sup>
-15	0,02	5,6± 0,53 <sup>a</sup>	605,01± 12,29 <sup>e</sup>	9,0± 0,21 <sup>ab</sup>	10,5± 0,17 <sup>c</sup>	109,24± 2,19 <sup>b</sup>	66067,09± 921,49 <sup>e</sup>
-15	0,1	11,3± 0,71 <sup>c</sup>	295,12± 9,12 <sup>a</sup>	9,1± 0,34 <sup>ab</sup>	8,2± 0,81 <sup>ab</sup>	195,49± 9,62 <sup>c</sup>	57693,01± 260,83 <sup>d</sup>

Примітка. Наведені середні значення 20-30 вимірювань (± SE). Для даних, відображених у кожному стовпці, суттєві відмінності позначаються різними літерами ( $P \leq 0,05$ ).

Відомо, що набряк і хвилястість тилакоїдів у хлоропластах є ранніми симптомами холодового стресу в рослинній клітині [8]. Мінусова або низька плюсова температура також здатні спричинювати пошкодження клітинних оболонок, денатурацію білків, накопичення токсичних речовин і навіть загибель клітин [331].



Результати наших експериментів показали, що після обробки листків сахарозою (0,02 або 0,1 М) кількість тилакоїдів з розрахунку на грану порівняно з контролем (0 М Сах) зменшилась відповідно на 23 та 26%, довжина тилакоїдів гран збільшилась на 16 і 74%, їх товщина збільшилась на 12 і 22%, ширина люмену у грані підвищилася на 11 і 14%, а висота грани зменшилась на 15 і 13%. Площа зрізу гран практично не змінювалася при 0,02 М Сах, але при 0,1 М Сах вона суттєво збільшувалась (на 52%) переважно завдяки значному збільшенню (на 74%) довжини тилакоїдів (див. табл. 6.1) [332]. Таким чином, після обробки сахарозою тилакоїди не мали жодних ознак набрякання та хвилястості і були щільніше упаковані порівняно з контрольними рослинами, що вказує на важливість ролі сахарози в оптимізації структури хлоропластів, спрямованої на зменшення руйнівного впливу низьких плюсових температур (рис. 6.1 Б, В).

Після поступового охолодження листків до температури  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  у хлоропластах контрольних рослин (не оброблених сахарозою) виявлявся різкий набряк гран, а у листків, оброблених розчином сахарози, набряки і хвилястість були значно меншими (рис. 6.1 Г, Е). Обробка сахарозою призвела до збільшення кількості тилакоїдів в розрахунку на грану при 0,02 М Сах та 0,1 М Сах (відповідно на 17 та 119%), тоді як довжина тилакоїдів гран зменшилась на 33 і 22%, а товщина тилакоїдів на 3 і 22%. Ширина люмінального простору тилакоїдів гран при 0,02 М Сах зменшилась на 2%, а при 0,1 М Сах залишалася незмінною (див. табл. 6.1). Збільшення кількості тилакоїдів гран на 119% при 0,1 М Сах, призвело до збільшення площі гран на 53%.

Зі зниженням температури до  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  деструкції хлоропластів контрольних листків не виявлялося, але спостерігалась фрагментація і набряк гран, очевидно, тому їх тилакоїди набули хвилеподібної форми (рис. 6.1 Є). Порушення структури тилакоїдів гран призвели до нерівномірності ширини люмінального простору, що могло негативно відобразитись на ефективності функціонування ФСА (див. підрозділ 5.2). При низькій температурі ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в листках, оброблених 0,02 М Сах, ступінь набрякання та неоднорідність

структури тилакоїдів гран не змінювались порівняно з контролем (рис. 6.1 Ж). Встановлено, що в цих хлоропластах кількість тилакоїдів на грану, товщина тилакоїду змінювались незначно, однак площа гран подвоїлася порівняно з відповідними контрольними даними (при  $p \geq 0,05$ ) за рахунок значного збільшення довжини тилакоїдів гран (див. табл. 6.1) У листків, які попередньо оброблялись розчином 0,1 М Сах, при цій же температурі численні тилакоїди мали незначні ознаки набряку, але були щільно упаковані у гранах (рис. 6.1 З). Кількість тилакоїдів на грану збільшилась до 11, тобто була вдвічі більшою порівняно з контролем, тоді як їх довжина і товщина залишались незмінними. При цьому ширина люмінального простору в гранах знизилась на 25%, тоді як площа гран збільшилась на 82% порівняно з контролем (0 М Сах) завдяки значно більшій кількості тилакоїдів.

При температурі  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  порівняно з контролем у листках, оброблених 0,02 та 0,1 М Сах, товщина тилакоїдів знизилась незначно (відповідно на 4 і 3%), а ширина люмінального простору на 25% при додаванні 0,1 М Сах. Незважаючи на зменшення товщини тилакоїдів і їх люмінального простору, у гран проявлялась тенденція до збільшення їх площі зрізу. Зокрема, при 0,02 М Сах, площа збільшилась на 108% внаслідок збільшення довжини тилакоїдів (на 105%), а при обробці 0,1 М Сах внаслідок збільшення кількості тилакоїдів на 113% (понад 2 рази) (див. табл. 6.1).

Варто зауважити, що порівняно з даними, отриманими при  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , при обробці 0,02 М Сах за температури  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  кількість тилакоїдів була менше на 10%, проте вона була вище на 88% при додаванні 0,1 М Сах. При такому ж порівнянні товщина тилакоїду була більшою як з 0,02 М Сах, так і з 0,1 М Сах, відповідно на 18% та 10%. Площа зрізу грани при 0,02 М Сах була вище на 31% внаслідок збільшення кількості тилакоїдів (на 16%), а також їх товщини (на 18%); при обробці 0,1 М Сах значення площі зменшилось на 26% переважно внаслідок зменшення довжини тилакоїдів на 62% та їх ширини на 9% (див. табл. 6.1).

У листках, оброблених розчином 0,1 М Сах, ультраструктура гран зазнала значних змін при  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  (див. рис. 6.1 З) у порівнянні з відповідним контролем без Сах (див. рис. 6.1 Є). Наявність високих гран, утворених з щільно упакованих, відносно коротких тилакоїдів, і відсутність деформацій тилакоїдів вказує на кріопротекторні властивості 0,1 М Сах та на участь сахарози в забезпеченні стійкості структури гран до низьких температур. У природних умовах холодостійкість рослин формується завдяки поступовому впливу низьких позитивних температур, цей процес відомий як “холодова акліматизація” [333]. Під час холодової акліматизації концентрація сахарози збільшується [334, 335], що призводить до експресії генів в клітинах, змін структури мембранних комплексів [336, 337], активування механізмів захисту клітин від холодового стресу та замерзання. В умовах, сприятливих для розвитку рослин, збільшення сахарози стимулює індукцію цвітіння і активує раннє старіння, але за умов впливу низьких температур сахароза здатна виконувати роль осмопротектору, а також завдяки взаємодії з ліпідним шаром мембран, забезпечувати їх захист від руйнуючого впливу зневоднення і замерзання [338].

## **6.2. Вплив екзогенної сахарози на функціональні показники фотосинтетичного апарату за низьких температур**

Зміни ультраструктури гран в хлоропластах можуть бути пов’язані зі змінами фотохімічної активності ФСА [339]. Рівень фотохімічної активності хлоропластів виявляють за станом фотосистеми II (ФСII), ключовим трансмембранним пігментним білковим комплексом в хлоропластах, який забезпечує поглинання та перетворення світлової енергії, а також відіграє провідну роль у захисті фотосистеми від фотоінгібування [340]. У нашому дослідженні, ефект сахарози на функціональний стан тилакоїдів гран в хлоропластах *G. nivalis* за низьких температур визначали із застосуванням методу кінетики індукційної флуоресценції хлорофілу *a*. Результати експериментів показали, що максимальний квантовий вихід перетворення

фотохімічної енергії ( $F_v / F_m$ ) у пристосованих до темряви загартованих листків різко зменшувався (від 0,79 до 0,38) зі зниженням температури від +5 до  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  (рис. 6.2 А).

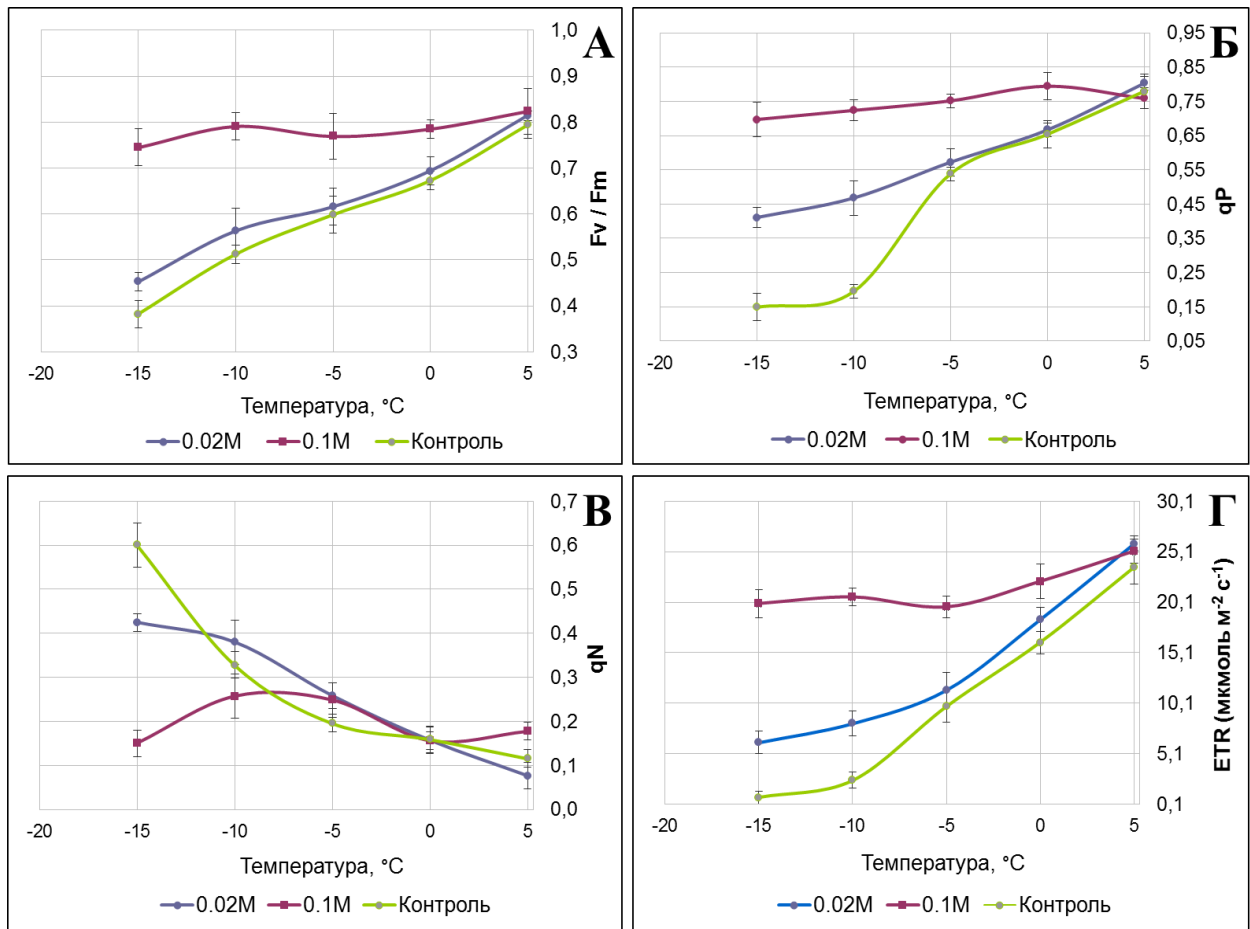


Рис. 6.2. Залежність показників флуоресценції хлорофілу листків *G. nivalis* від температури та обробки розчинами 0,02 і 0,1 М Сах: (А) потенціал максимального квантового виходу фотохімії ФСII ( $F_v / F_m$ ) у листків, пристосованих до темряви; (Б) фотохімічне гасіння ( $qP$ ); (В) нефотохімічне гасіння ( $qN$ ); і (Г) швидкість транспортування електронів (ETR). Достовірність різниці з контролем при  $p \leq 0,05$ .

Відомо, що значення  $F_v / F_m$ , наближене 0,82, є характерним для ФСА непошкоджених рослин [157]. У нашому дослідженні значне зниження  $F_v / F_m$ , тобто фотосинтетичної ефективності ФСА *G. nivalis* (див. рис. 6.2 А) проявлялось у загартованих контрольних рослин за умов впливу вище

зазначених мінусових температур. Подібний ефект мінусових температур спостерігався і на фотохімічному гасінні флуоресценції ( $qP$ ), який відображає ступінь окислення первинних акцепторів  $Q_A$  [244], тобто частини відкритих реакційних центрів ФСII (рис. 6.2 Б) та рівнем швидкості перенесення електронів (рис. 6.2 Г). Ці параметри також знижувалися при мінусових температурах.

Після експозиції в розчинах сахарози функціональні параметри ФСА загартованих листків набували відновлення до значень, зафіксованих при плюсових температурах (+5 °C) (рис. 6.2 А, В, Д). Ці дані вказують на наявність стабілізуючого впливу сахарози на функціональний стан ФСА у листах *G. nivalis* за умов впливу мінусових температур (див. рис. 6.2 А, В, Д). Необхідно зазначити, що ультраструктурні зміни тилакоїдів гран оброблених листків (див. рис. 6.1) корелювали із відносною стійкістю функціонування ФСII в хлоропластах (див. рис. 6.2 А). Залежність нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу ( $qN$ ) від обробки сахарозою (рис. 6.2 В) відрізнялась від інших функціональних параметрів листків *G. nivalis* за цих температурних умов (рис. 6.2 А, Б, Г). Відомо, що коефіцієнт  $qN$  характеризує зміни теплової дисипації в комплексах ФСII і забезпечує механізм захисту від фотоінгібування [245]. Згідно з даними, наведеними на рис. 6.2 В, обробка сахарозою зумовила зменшення значення цього показника при експозиції ефемероїда *G. nivalis* до мінусових температур. Межі оптимальних температур для активування ФСА у листках *G. nivalis* визначались значеннями коефіцієнтів фотохімічного ( $qP$ ) та нефотохімічного ( $qN$ ) гасіння флуоресценції хлорофілу. Раніше було встановлено, що коефіцієнт фотохімічного гасіння  $qP$  перевищує значення 0,5 при оптимальних температурах [244]. У контрольних листках *G. nivalis* температурні межі від +5 до -5 °C є оптимальними для функціонування ФСА, що відображено коефіцієнтами  $qP = 0,53$  (див. рис. 6.2 Б) і  $qN = 0,19$  (див. рис. 6.2 В). Такі ж межі оптимальних температур для функціонування ФСА з коефіцієнтами  $qP = 0,57$  і  $qN = 0,25$  були притаманні експериментальним листкам, які експонувались в розчині 0,02 М Сах.

Значне розширення меж оптимальних температур для функціонування ФСА було зафіксовано у листків, які обробляли більш концентрованим розчином сахарози (0,1 М). Зокрема, їх оптимальні температурні межі змінювались в межах від +5 до -15 °С, з коефіцієнтами  $qP = 0,69$  і  $qN = 0,15$ . Швидкість транспортування електронів в листках при поступовому зниженні температури від +5 до -5 °С також зменшувалась, але у листках, оброблених розчином 0,1 М Сах, це зниження було повільнішим порівняно з листками, обробленими 0,02 М Сах (див. рис. 6.2 Г). З подальшим зниженням температури від -5 до -15 °С, в листках, оброблених розчином 0,1 М Сах, швидкість перенесення електронів зменшувалась і мала тенденцію до стабілізації при досягненні значення показника 20,1 [332]. За цих же умов в листах, оброблених 0,02 М Сах, швидкість транспортування електронів не могла стабілізуватися, але продовжувала знижуватися повільніше, ніж у контрольних листків, що, очевидно пов'язано з недостатнім ефектом впливу низької концентрації екзогенної сахарози.

Результати раніше проведених експериментів показали, що у листках холодостійких рослин за низьких температур можуть проявлятися одночасні зміни в ультраструктурі та функціонуванні фотосинтетичного апарату [308, 317, 319, 320]. Подібні ультраструктурні зміни виявлені нами і в контрольних листках *G. nivalis*, проте обробка розчином 0,1 М Сах не тільки запобігла в подальшому руйнуванню хлоропластів при мінусових температурах, але й зменшила деформацію тилакоїдів гран та вплинула на ефективність функціонування ФСА.

Отримані дані вказують на те, що у *G. nivalis* за низьких температур сахароза бере участь у фотохімічних та структурних змінах ФСА, які спрямовані на забезпечення ефективності його функціонування. Такі структурні зміни тилакоїдів гран у ефемероїдів, які розвиваються за низьких температур, можна вважати адаптивною ознакою ФСА. Виявлені ефекти впливу екзогенної сахарози на ультраструктуру та функціонування ФСА *G. nivalis* вказують, що сахароза може брати участь в регулюванні

фотосинтезу і має кріопротекторні властивості, які захищають тилакоїди і грани хлоропластів від впливу мінусових температур у весняний період розвитку.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 6, були опубліковані у статті: Fediuk OM, Bilyavska NO, Zolotareva OK (2017) Effects of sucrose on structure and functioning of photosynthetic apparatus of *Galanthus nivalis* L. leaves exposed to chilling stress. *Annals Society for Cell Biol XXI(3): 43-51.*  
doi: 10.ANN/RSCB-2018-0002:RSCB

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Температура навколишнього середовища є одним з найважливіших факторів, що обумовлюють ріст, розвиток і поширення рослин в певних кліматичних зонах [341]. Незважаючи на те, що в останні десятиліття спостерігається підвищення середньорічної температури, для більшості країн Європи актуальність проблеми холодо- і морозостійкості рослин не тільки не знижується, а й зростає [342]. В останні роки в Україні відзначається велика амплітуда температур в зимовий і весняний періоди від високих до низьких, а в найближчому майбутньому прогноуються аномально холодні зими з різкими перепадами температур і недостатністю снігового покриву [343]. Крім сільськогосподарського аспекту, проблема холодо- і морозостійкості має важливе природно-екологічне значення, оскільки здатність рослин адаптуватися до певних умов перезимівлі в різних частинах планети – один з чинників, що визначає ареали поширення диких видів [341].

Дослідження структурних особливостей клітинних органел листка рослин різних груп з метою пізнання закономірностей екологічної диференціації видів і вивчення шляхів адаптації рослинного організму є однією з важливих задач ботаніки та клітинної біології рослин. Просторова організація структурних елементів клітин листка має важливе значення в формуванні адаптивної реакції виду, оскільки визначає такі життєві функції рослинного організму, як фотосинтез, дихання та транспірацію.

Ефемероїди, багаторічні трав'яні рослини, для яких характерний ранньовесняний тип вегетації, піддаються одночасній дії комплексу несприятливих факторів. Рослини виду *Galanthus nivalis* L., які одними з перших на території України з'являються на поверхні ґрунту навіть з під шару снігу і починають квітнути наприкінці лютого або на початку березня, по праву можуть вважатися еталоном екологічної стійкості. Тому дослідження на клітинному рівні листків цих рослин, що пристосувалися до суворих умов існування, дозволяють визначити найбільш загальні шляхи адаптації рослин до



екологічного стресу і зрозуміти структурно-функціональні механізми їх стійкості.

Поява з ґрунту та подальший ріст листків рослин *G. nivalis* за низьких температур ґрунту та атмосферного повітря відбувається завдяки існуванню надійного захисту поверхні листків, який забезпечується товстим шаром кутикули та екстракутикулярного воску. Останній представлений поліморфними структурами (від пластинчастих, лопатеподібно-пластинчастих до стрижнеподібних кристалоїдів), які рясно вкривають кутикулярний шар листової поверхні. Швидкий ріст таких воскових структур на листках рослин *G. nivalis*, що спостерігали німецькі вчені за допомогою метода атомної силової мікроскопії [274], може пом'якшити вплив температурних коливань, високого рівня освітленості, захистити від частинок ґрунту та обмежити втрати води через транспірацію [344].

Необхідність збереження води в листках цього ефемероїда підтверджується також отриманими нами кількісними даними про стан продихів. З'ясовано, що *G. nivalis* належать до групи рослин з малою щільністю продихів. Значна частина продихів на етапі проростання виявилася закритою. Повне закриття продихів було зареєстровано нами на адаксіальній поверхні та лише часткове їх відкриття у 20% продихів на абаксіальній поверхні молодих листків *G. nivalis*, тоді як у період квітнення, навпаки, відсоток відкритих продихів на адаксіальній стороні досягав 59% і на абаксіальній – 30%. Отримані дані вказують на те, що рівень продихової транспірації у молодих листків *G. nivalis* є досить низьким, принаймні, меншим, ніж під час квітнення. Відомо, що коли потенціал вологості листків низький через значний вихід води, викликаний високими рівнями транспірації та/або кутикулярної провідності [345], або через слабкий приплив води, спричинений низькою гідравлічною провідністю від ґрунту до листків [346], продихи закриваються, щоб зберегти воду і уникнути емболії в ксилемі судин, викликаній кавітацією. Не можна також виключати того, що індуковане холодом закриття продихів може відбуватися шляхом прямого впливу низької температури на їх замикаючі

клітини, очевидно, зачіпаючи ферменти та іонні канали, які забезпечують активне підтримання осмотичного потенціалу в цих клітинах.

Фотосинтез і дихання є основними шляхами метаболізму вуглецю і енергії в рослині. Фотосинтез використовує світлову енергію,  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$  для регуляції синтезу вуглеводів і вивільнення  $\text{O}_2$ . Потім дихання використовує ці вуглеводи для збереження росту і підтримки через забезпечення вуглецевими інтермедіатами відновлення еквівалентів і АТФ. Ці процеси, у свою чергу, вивільняють  $\text{CO}_2$  і перетворюють  $\text{O}_2$  на  $\text{H}_2\text{O}$ . В літературі накопичено великий об'єм інформації стосовно впливу низьких температур на ці процеси, проте недостатньо інформації про їх вплив на клітинні органели, що забезпечують енергетичний метаболізм, у рослин, які в процесі еволюції пристосувалися до росту, розвитку та розмноження за низьких температур.

Нами виявлено на субклітинному рівні основні закономірності перебудов організації мітохондрій та хлоропластів листків *G. nivalis* при адаптації рослин до умов поступового підвищення температур повітря та ґрунту. На початку появи листків підсніжника з ґрунту вся популяція мітохондрій представлена округлими формами з недостатньо розвинутою системою крист і матриксом помірної щільності, що свідчить про процеси мультиплікації цих органел та відносно невисокий рівень їх функціональної активності; останній висновок підтверджується даними про інтенсивність загального дихання листків. Протягом вегетації більша частина мітохондрій має видовжену форму з добре розвинутими кристами і більш конденсованим матриксом, що вказує на високу активність мітохондрій в період прискореного росту листків. На етапі бутонізації матрикс все ще видовжених мітохондрій поступово просвітлюється, що вказує на зниження їх функціональної активності і співпадає зі зменшенням рівня загального дихання при уповільненні темпів росту листків. В період квітнення більшість мітохондрій має округлу форму, помірну кількість вкорочених крист та електронно-прозорий матрикс, демонструючи ознаки зниження їх функціональної активності.

Варто зазначити, що характерною особливістю цього виду ефемероїдів є вологолюбність. Так, спостерігається збільшення щільності його популяції по пониженнях рельєфу, в зв'язку з достатнім забезпеченням вологою в цих екотопах [2]. Підтвердженням цього служать результати проведених нами експериментів, які показали існування високого рівня прямої кореляційної залежності інтенсивності загального дихання від ступеня вологості. Що стосується альтернативного (ціанід-незалежного) шляху дихання, то його динаміка, особливо на початку вегетації рослин *G. nivalis*, певною мірою співпадала зі змінами температури повітря, демонструючи обернену кореляційну залежність.

Протягом останніх десятиліть основна увага дослідників була зосереджена на реєстрації вмісту та активності альтернативної оксидази (АО), яка забезпечує альтернативний шлях дихання [163]. Зокрема, встановлено, що польові альпійські трави мають більш високі рівні білка АО в холодні місяці [347], в інших дослідженнях також виявлено більший вміст білка АО у рослин, вирощених при низьких температурах [348, 349]. Використовуючи ізотопний аналіз, дослідниками були визначені зміни активності АО у відповідь на зміни температури. Так, в рослинах арабідопсиса спостерігалось тимчасове збільшення активності АО за тривалого охолодження (в перші 10 днів за температури 5 °C), з подальшим поверненням до більш низької активності протягом більш довгого терміну [350]. Також виявлено підвищений вміст білка АО у рослин, що розвивалися за низьких температур, у порівнянні з рослинами, які вирощували у теплі, і що ріст у нокдаун-рослин зі зниженою експресією АО при був меншим при охолодженні, ніж при оптимальній температурі [351], що вказує на її важливу довгострокову роль для альтернативного шляху дихання. Отже, ми можемо припустити збільшення експресії генів АО і/або підвищення її активності, які могли викликати сплеск альтернативного дихання в період вегетації рослин *G. nivalis* за низьких температур.

Суттєву гетерогенність і динамізм змін структури хлоропластів виявлено нами в клітинах листків *G. nivalis* на різних етапах їх ранньовесняного

розвитку. Так, в період появи листків з ґрунту спостерігалися переважно видовжену форму іноді зі струмулами; в електронно-щільній стромі розрізнялися низькі грани з декількох тилакоїдів, тилакоїди строми та нечисленні пластоглобули, що підтверджувалося найнижчими показниками площ гран та тилакоїдів і вказувало на початкову стадію формування фотосинтетичного апарату. Протягом вегетативного етапу поступово підвищувалися та досягали максимуму значення площ хлоропластів, гран та тилакоїдів; хлоропласти набували класичної еліпсоїдної форми; збільшувалася висота гран за рахунок підвищення кількості тилакоїдів на грану, вздовж оболонки органел з'являлися везикули периферичного пластидного ретикулума. Вважається, що поява останнього зумовлена пришвидшенням обмінних процесів органел з гіалоплазмою [352]. Дослідження фотосинтезу листків показали, що за дії низьких температур в хлоропластах *G. nivalis* забезпечувався високий рівень ефективного квантового виходу фотохімічного перетворення енергії; це, очевидно, пов'язано з особливостями структури тилакоїдів і гран хлоропластів, що запобігають руйнуванню фотосистеми II. На генеративному етапі відбувалося поступове зниження усіх названих вище показників структури хлоропластів *G. nivalis*, що вказує на зниження рівня фотосинтезу в листках за умов розвитку генеративних органів рослини.

Таким чином, енергетичні органели клітин листків *G. nivalis* характеризувалися структурним динамізмом впродовж усіх етапів їх ранньовесняного розвитку. Морфологічна пластичність хлоропластів проявлялася у змінах їх форм, варіабельності кількісних характеристик мембранних компонентів, утворенні виростів, струмул, в напрямку суміжних органел, які збільшують площу контакту і зменшують відстань між компартментами клітин. Структура мітохондрій зазнавала змін форми (округла, видовжена), кількісних характеристик крист, електронної щільності матрикса, мембран і оболонок. Таким чином, виявлені нами структурні та функціональні характеристики енергетичних органел клітин листків *G. nivalis* за низьких температур на етапах появи листків з ґрунту та вегетації можуть вважатися

ознаками їх адаптаційної здатності до виживання за мінливих кліматичних умов.

У клітинах листків досліджених видів рослин Арктики та Антарктики хлоропласти також утворюють довгі вирости, які збільшують контактну поверхню між сусідніми клітинними компартментами [281]. Такі особливості органел вказують на тісну взаємодію і дуже інтенсивні обмінні процеси, що можуть мати важливе значення для росту рослин в суворих екологічних умовах, які вимагають підтримання енергетичного балансу на високому рівні [281]. Також у чотирьох видів арктичних та антарктичних рослин було виявлено накопичення значної кількості сахарози в результаті холодових обробок, яким піддавались ці рослини [353]. Останнім часом були отримані відомості, що екзогенна обробка проростків арабідопсису 40 мМ сахарозою в темряві призводить до збільшення кількості пластид, які утворюють струмули [90, 354, 355].

Відомо, що одним із механізмів адаптації рослин до холодового стресу є накопичення сумісних осмолітів, серед яких особлива роль належить сахарозі. Нами вперше було показано, що сахароза бере активну участь у стабілізації структури гранальної системи хлоропластів *G. nivalis*. Обробка екзогенною 0,1 М сахарозою сприяла збереженню інтактності гран, збільшенню кількості тилакоїдів та площі гран за мінусових температур (від  $-5$  до  $-15$  °C), що запобігало пошкодженню структури фотосинтетичного апарату і забезпечувало його ефективне функціонування за низьких температур.

Накопичення сахарози як ранньої реакції на охолоджуючий стрес виявлено в тканинах *Haberlea rhodopensis*, виду надзвичайно стійкого до висихання, а також у чутливого до стресу *Arabidopsis thaliana* і стійкого до стресу *Thellungiella halophyla* [356]. Вважається, що збільшення концентрації сахарози може бути результатом зменшення накопичення транзиторного крохмалю в хлоропластах за низьких температур [357, 358]. Це збігається з результатами наших ультраструктурних досліджень, які показали повну

відсутність крохмальних зерен у хлоропластах листків *G. nivalis* на всіх етапах ранньовесняного розвитку.

У рослинах арабідопсиса холодний стрес індукує швидке накопичення сахарози і моносахаридів – глюкози і фруктози [357]. Перерозподіл вуглецю в напрямку накопичення сахарози може бути результатом як обмеження флоемного експорту, так і інгібування синтезу крохмалю внаслідок накопичення фосфорильованих інтермедіатів [357]. Біосинтез сахарози при низькій температурі в рослинах *Arabidopsis*, які надмірно експресують фосфатсахарозосинтазу, знижував гальмування фотосинтезу, підтримував мобілізацію вуглеводів із листків до стоку і підвищена швидкість, при якій розвинулася стійкість до заморозків [359]. Холодний стрес, що поєднується з високою інтенсивністю світла, викликає фотоінгібування фотосинтезу в хлоропластах, впливає на цілісність плазматичної мембрани [359] і ультраструктуру різних органел, особливо хлоропластів. Можливо, що сахароза, яка здатна знижувати латеральну рухливість фосфоліпідів в повністю регідратированій мембрані, може запобігти зниженню плинності мембран, яке відбуваються при 0–4 °C [360]. Таким чином, захисну роль сахарози можна було б пояснити не тільки її осмопротекторною роллю (у цитозолі і вакуолі), але також як сумісного осмоліту, що захищає структуру мембран. Останнім часом запропонована концепція, згідно якої такі цукри, як сахароза і фруктани, що можуть чинити непрямий вплив на класичний антиоксидантний механізм, також беруть участь у прямому гасінні активних форм кисню (АФК) в різних органелах, тим самим сприяючи стійкості до абіотичного стресу [361]. Однак роль сахарози як прямого знищувача АФК ще не доведена.

Глибоке розуміння ролі структурних змін крист і тилакоїдів в механізмах функціонування мітохондрій і хлоропластів за низьких температур, сприятиме знайденню шляхів підвищення ефективності дихання і фотосинтезу дикорослих та сільськогосподарських культур, нестійких до впливу абіотичних факторів. Крім цього, розкриті принципи організації і змін мембран енергетичних органел є важливою інформацією, врахування якої сприятиме успішності

розробки штучних енергетичних систем, складовими яких є дихання і фотосинтез.

Отже, *G. nivalis* розглядається нами як модельний об'єкт, на якому можна вивчати широкий спектр адаптивних реакцій рослин на вплив абіотичних факторів природи, зокрема, низької температури, вологості і високої освітленості. Отримані нами результати дослідження розширюють уявлення про роль структурних перебудов енергетичних органел у формуванні адаптаційних механізмів, які забезпечують стійкість дихання і фотосинтезу рослин до впливу абіотичних факторів природного середовища.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати дослідження структурних особливостей мітохондрій, хлоропластів, продихів і поверхні листків *G. nivalis* за низьких температур. Виявлено закономірності змін ультраструктури мітохондрій і хлоропластів та їх роль в диханні і фотосинтезі ефемероїда на різних етапах його весняного розвитку. Встановлено кріопротекторну роль сахарози в забезпеченні функціонування фотосинтетичного апарату за низьких температур. Результати проведених досліджень, розширюють уявлення про структурно-функціональні зміни мітохондрій і хлоропластів в клітинних та субклітинних механізмах адаптації листків *G. nivalis* до низьких температур. Запропоновано використовувати цей вид рослин як модельний об'єкт, на якому зручно вивчати широкий спектр адаптивних реакцій рослин на вплив несприятливих абіотичних факторів.

1. За умов впливу мінусових температур на вегетативному етапі розвитку ефемероїда виявлено найвищі темпи росту листків порівняно з періодом квітнення. Низький рівень продихової транспірації, особливо у молодих листків, проявлявся через повне закриття продихів на адаксіальній поверхні та лише часткове їх відкривання (у 20 % продихів) на абаксіальній стороні, тоді як під час квітнення ці показники збільшувалися, відповідно до 59 та 30 %, що свідчить про важливу роль продихів в загальній стратегії регулювання водного балансу і дихання за низьких температур.

2. Виявлено, що на кутикулі листків *G. nivalis* кристалоїди воску у вигляді вигнутих пластинок формують нерівну поверхню, яка здатна розсіювати надмірний потік фотонів, що сприяє запобіганню перегріву листків і руйнуванню фотосинтетичного апарату.

3. Встановлено, що мітохондрії за мінусових температур при появі листків з ґрунту були інтактними, з помірно розвинутими кристами і перебували в неактивному функціональному стані. В подальшому за низьких температур збільшувались не тільки розміри площі зрізу мітохондрій, але й



об'єми їх крист, що, очевидно, вказує на підвищення метаболічної активності. Максимальні значення інтенсивності загального та ціанід-резистентного дихання відповідають ранній і пізній стадіям вегетативного етапу розвитку ефемероїда, що свідчить про зв'язок структурних змін мітохондрій з модифікаціями їх метаболізму.

4. Виявлено, що на етапі появи листків з ґрунту хлоропласти були менш розвиненими, порівняно з вегетативним етапом розвитку. На етапі квітнення при підвищенні температури повітря кількість тилакоїдів в гранах зменшувалась, проте зберігалася площа зрізу гран завдяки видовженню тилакоїдів. Результати дослідження фотосинтезу листків показали, що за низьких температур структурні зміни тилакоїдів і гран хлоропластів сприяють забезпеченню високого рівня ефективного квантового виходу фотохімічного перетворення енергії і запобігають руйнуванню фотосистеми II.

5. Вперше встановлено ефект стабілізації структури гранальної системи хлоропластів листків *G. nivalis* після обробки екзогенною сахарозою. Обробка 0,1 М Сах сприяє збереженню інтактності гран, збільшенню кількості тилакоїдів та площі гран за мінусових температур (від  $-5$  до  $-15$  °C), що запобігає пошкодженню структури фото-синтетичного апарату і забезпечує його ефективне функціонування за низьких температур.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nelson GC, Valin H, Sands RD, et al (2014) Climate change effects on agriculture: Economic responses to biophysical shocks. *Proc Natl Acad Sci* 111:3274–3279
2. Мельник ВІ, Діденко СЯ (2013) Види роду *Galanthus* L. (Amaryllidaceae) в Україні: НБС НАН України, Київ
3. Budnikov G (2017) Life cycle of *Galanthus nivalis* L. *Наук зап Терноп нац пед ун-ту Сер Біол* 1:40–48
4. Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA (2011) Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:79–104
5. Vanlerberghe G (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int J Mol Sci* 14:6805–6847
6. Kenchanmane Raju SK, Barnes AC, Schnable JC, Roston RL (2018) Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant Sci* 276:73–86
7. Voinikov VK (2018) Energetic and Information Systems of Plant Cells At Temperature Fluctuations. *Proc All-Russian Sci Conf with Int Particip Sch Young Sci Mech Resist plants Microorg to unfavorable Environ.* doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-6-8
8. Kratsch HA, Wise RR (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell Environ* 23:337–350
9. Zoldan D, Band RS, Guy CL, Porat R, Zoldan D., Band, R. S., Guy, C. L., & Porat R (2012) Understanding chilling tolerance traits using *Arabidopsis* chilling-sensitive mutants. In *Environmental Adaptations and StressTolerance of Plants in the Era of Climate Change.* *Environ Adapt Stress Toler Plants Era Clim Chang.* doi: 10.1007/978-1-4614-0815-4\_7
10. Yang Y-J, Chang W, Huang W, Zhang S-B, Hu H (2017) The effects of chilling-light stress on photosystems I and II in three *Paphiopedilum* species.

Bot Stud 58:53

11. Zhang F, Zhu XQ, Guo YL, Wan XQ, Lin TT, Chen QB, Liu M, Liu PQ (2014) Ultrastructural changes and dynamic expressions of FAD7, Cu/Zn-SOD, and Mn-SOD in *Neosinocalamus affinis* under cold stress. *Russ J Plant Physiol* 61:760–767
12. Krasensky-Wrzaczek J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63:1593–1608
13. Prasai K (2017) Regulation of mitochondrial structure and function by protein import: A current review. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol* 24:107–122
14. Day DA (2004) Mitochondrial Structure and Function in Plants. In: *Plant Mitochondria From Genome to Funct.* Springer, Dordrecht, pp 1–11
15. Perkins GA, Frey TG (2000) Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* 31:97–111
16. Van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N (2016) Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol* 41:33–42
17. Cooper GM (1997) *The cell: 2nd edition.* In: a Mol. approach. ASM Press, p 264
18. Walther DM, Rapaport D (2009) Biochimica et Biophysica Acta Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *BBA - Mol Cell Res* 1793:42–51
19. Губський ЮІ (2007) Біологічна хімія. Нова книга, Вінниця
20. Hrycyna C (2013) Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. In: *CHM333 Lect. 37 38.* Spring, pp 280–300
21. Wittig I, Schägger H (2008) Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1777:592–598
22. Ballmoos von C, Cook GM, Dimroth P (2008) Unique Rotary ATP Synthase and Its Biological Diversity. *Annu Rev Biophys* 37:43–64
23. Golovko T (1999) Plant respiration: physiological aspects. In: *Plant Respir. Physiol. Asp.* Nauka, St. Petersburg, pp 7–11
24. Bailey R (2018) *Electron Transport Chain and Energy Production Explained.*

- In: ThoughtCo. <https://www.thoughtco.com/electron-transport-chain-and-energy-production-4136143>. Accessed 18 Dec 2018
25. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Keith R, Peter W (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York
  26. Nocera DG (2012) The Artificial Leaf. *Acc Chem Res* 45:767–776
  27. Wise RR (2006) The Structure and Function of Plastids. 23:2–26
  28. Mustárdy L, Garab G (2003) Granum revisited. A three-dimensional model - Where things fall into place. *Trends Plant Sci* 8:117–122
  29. Kirchhoff H (2014) Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1837:495–502
  30. Anderson JM, Chow WS, Park Y II (1995) The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res* 46:129–139
  31. Kirchhoff H (2008) Molecular crowding and order in photosynthetic membranes. *Trends Plant Sci* 13:201–207
  32. Anderson JM, Chow WS, De Las Rivas J (2008) Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. *Photosynth Res* 98:575–587
  33. Puthiyaveetil S, Kirchhoff H, Höhner R (2016) Structural and Functional Dynamics of the Thylakoid Membrane System. In: Helmut Kirchhoff (ed) *Chloroplasts Curr. Res. Futur. Trends*. Caister Academic Press, pp 59–88
  34. Albertsson P-Å (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci* 6:349–354
  35. Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1706:12–39
  36. Staehelin LA (2003) Chloroplast structure: From chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynth Res* 76:185–196
  37. Amunts A, Drory O, Nelson N (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* 447:58–63

38. Allen JF, Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci* 6:317–326
39. Tomizioli M, Lazar C, Brugière S, et al (2014) Deciphering Thylakoid Sub-compartments using a Mass Spectrometry-based Approach. *Mol Cell Proteomics* 13:2147–2167
40. Johnson MP, Vasilev C, Olsen JD, Hunter CN (2014) Nanodomains of Cytochrome b6f and Photosystem II Complexes in Spinach Grana Thylakoid Membranes. *Plant Cell* 26:3051–3061
41. Chow W, Qian L, Goodchild D, Anderson J (1988) Photosynthetic Acclimation of *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don. *Aust J Plant Physiol* 15:107
42. Horton P (1999) Hypothesis: Are grana necessary for regulation of light harvesting? *Funct Plant Biol* 26:659
43. Anderson JM (1999) Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Funct Plant Biol* 26:625
44. Trissl H-W, Wilhelm C (1993) Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem Sci* 18:415–419
45. Bendall DS, Manasse RS (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim Biophys Acta* 1229:23–38
46. Cadoret JC, Demoulière R, Lavaud J, Van Gorkom HJ, Houmard J, Etienne AL (2004) Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (isiA). *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1659:100–104
47. Bailey S, Mann NH, Robinson C, Scanlan DJ (2005) The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in cyanobacteria. *FEBS Lett* 579:275–280
48. Mullineaux CW (2005) Function and evolution of grana. *Trends Plant Sci* 10:521–525
49. Kirchhoff H, Tremmel I, Haase W, Kubitscheck U (2004) Supramolecular photosystem II organization in grana thylakoid membranes: Evidence for a structured arrangement. *Biochemistry* 43:9204–9213

50. Kirchhoff H (2008) Molecular crowding and order in photosynthetic membranes. *Trends Plant Sci* 13:201–207
51. Tremmel I, Kirchhoff H, Weis E, Farquhar G. (2003) Dependence of plastoquinol diffusion on the shape, size, and density of integral thylakoid proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1607:97–109
52. Kirchhoff H, Mukherjee U, Galla H-J (2002) Molecular Architecture of the Thylakoid Membrane: Lipid Diffusion Space for Plastoquinone. *Biochemistry* 41:4872–4882
53. Blankenship RE (2002) Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science
54. Haferkamp S, Haase W, Pascal AA, van Amerongen H, Kirchhoff H (2010) Efficient Light Harvesting by Photosystem II Requires an Optimized Protein Packing Density in Grana Thylakoids. *J Biol Chem* 285:17020–17028
55. Haferkamp S, Kirchhoff H (2008) Significance of molecular crowding in grana membranes of higher plants for light harvesting by photosystem II. *Photosynth Res* 95:129–134
56. Ellis RJ (2001) Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* 26:597–604
57. Minton AP (2001) The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J Biol Chem* 276:10577–10580
58. Armbruster U, Labs M, Pribil M, et al (2013) Arabidopsis Curvature Thylakoid1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *Plant Cell* 25:2661–2678
59. Long SP, Marshall-Colon A, Zhu XG (2015) Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell* 161:56–66
60. Osterloh FE (2018) Artificial Photosynthesis with Inorganic Particles. In: *Integr. Sol. Fuel Gener.* pp 214–280
61. Halmeck W (2017) What is the photolysis of water in photosynthesis? In:

- Quora. <https://www.quora.com/What-is-the-photolysis-of-water-in-photosynthesis>.
62. Jablonsky J, Bauwe H, Wolkenhauer O (2011) Modeling the Calvin-Benson cycle. *BMC Syst Biol* 5:185
  63. Jensen E, Clément R, Maberly SC, Gontero B (2017) Regulation of the calvin – Benson – Bassham cycle in the enigmatic diatoms: Biochemical and evolutionary variations on an original theme. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. doi: 10.1098/rstb.2016.0401
  64. Touch P by M (2018) The Calvin Cycle - Biology LibreTexts. In: Libr. Libr. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory\\_and\\_General\\_Biology/Book%3A\\_General\\_Biology\\_\(Boundless\)/8%3A\\_Photosynthesis/8.3%3A\\_The\\_Light-Independent\\_Reactions\\_of\\_Photosynthesis/8.3B%3A\\_The\\_Calvin\\_Cycle](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_General_Biology_(Boundless)/8%3A_Photosynthesis/8.3%3A_The_Light-Independent_Reactions_of_Photosynthesis/8.3B%3A_The_Calvin_Cycle). Accessed 3 Jan 2019
  65. Millar AH (2007) The plant mitochondrial proteome. In: *Plant Proteomics*. Elsevier Current Trends, pp 226–246
  66. Taylor NL, Tan Y-F, Jacoby RP, Millar AH (2009) Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *J Proteomics* 72:367–378
  67. Alverson AJ, Rice DW, Dickinson S, Barry K, Palmer JD (2011) Origins and Recombination of the Bacterial-Sized Multichromosomal Mitochondrial Genome of Cucumber. *Plant Cell* 23:2499–2513
  68. Jacoby RP, Li L, Huang S, Pong Lee C, Millar AH, Taylor NL (2012) Mitochondrial Composition, Function and Stress Response in Plants. *J Integr Plant Biol* 54:887–906
  69. Ziogas V, Tanou G, Filippou P, Diamantidis G, Vasilakakis M, Fotopoulos V, Molassiotis A (2013) Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant Physiol Biochem* 68:118–126
  70. Rurek M (2014) Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions. *Mitochondrion* 19:289–294
  71. Bultema JB, Braun HP, Boekema EJ, Kouřil R (2009) Megacomplex

- organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1787:60–67
72. Tan YF, Millar AH, Taylor NL (2012) Components of mitochondrial oxidative phosphorylation vary in abundance following exposure to cold and chemical stresses. *J Proteome Res* 11:3860–3879
  73. Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA (2011) Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:79–104
  74. Xu C, Huang B (2010) Differential proteomic response to heat stress in thermal *Agrostis scabra* and heat-sensitive *Agrostis stolonifera*. *Physiol Plant* 139:192–204
  75. Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH (2005) Differential Impact of Environmental Stresses on the Pea Mitochondrial Proteome. *Mol Cell Proteomics* 4:1122–1133
  76. Taylor NL, Day DA, Millar AH (2002) Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J Biol Chem* 277:42663–8
  77. Byun YJ, Kim HJ, Lee DH (2009) LongSAGE analysis of the early response to cold stress in *Arabidopsis* leaf. *Planta* 229:1181–1200
  78. Nogueira FTS, Borecký J, Vercesi AE, Arruda P (2005) Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants. *Biosci Rep* 25:209–26
  79. Kolesnichenko A V., Grabelnych OI, Pobezhimova TP, Voinikov VK (2000) The association of plant stress uncoupling protein CSP 310 with winter wheat mitochondria in vitro during exposure to low temperature. *J Plant Physiol* 156:805–807
  80. Kolesnichenko A V., Grabelnych OI, Pobezhimova TP, Voinikov VK (2005) Non-phosphorylating bypass of the plant mitochondrial respiratory chain by stress protein CSP 310. *Planta* 221:113–122
  81. Sweetlove LJ, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-nesi A, Taylor NL, Baxter



- CJ, Eickmeier I, Fernie AR (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required.pdf. 103:3–8
82. Kratsch HA, Wise RR (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell Environ* 23:337–350
83. Lütz C (2013) Plants in Alpine regions: Cell physiology of adaption and survival strategies. *Plants Alp Reg Cell Physiol Adapt Surviv Strateg* 1–202
84. Meltofte H, Barry T, Berteaux D, Bültmann H, Christiansen JS (2013) Arctic Biodiversity Assessment. Status and Trends in Arctic Biodiversity. Conservation of Arctic Flora and Fauna, Akureyri, Iceland
85. Smith RIL (2003) The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. In: Huiskes A, Gieskes W, Rozema J, Schorno R, Van der Vies S, Wolff W (eds) *Antarct. Biol. a Glob. Context*, Huiskes AG. Backhuys, Leiden, pp 234–239
86. Cavieres LA, Hernández-Fuentes C, Sierra-Almeida A, Kikvidze Z (2016) Facilitation among plants as an insurance policy for diversity in Alpine communities. *Funct Ecol* 30:52–59
87. Gielwanowska I, Szczuka E, Bednara J, Górecki R (2005) Anatomical features and ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) leaves from different growing habitats. *Ann Bot* 96:1109–19
88. Gielwanowska I, Pastorczyk M, Lisowska M, Węgrzyn M, Górecki R (2014) Cold stress effects on organelle ultrastructure in polar Caryophyllaceae species. *Polish Polar Res* 35:627–646
89. Hanson MR, Hines KM (2017) Stromules: Probing Formation and Function. *Plant Physiol* 176:pp.01287.2017
90. Schattat MH, Klösgen RB (2011) Induction of stromule formation by extracellular sucrose and glucose in epidermal leaf tissue of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 11:115
91. Schattat M, Barton K, Mathur J (2011) Correlated behavior implicates stromules in increasing the interactive surface between plastids and ER tubules. *Plant Signal Behav* 6:715–718

92. Schattat MH, Barton KA, Mathur J (2014) The myth of interconnected plastids and related phenomena. *Protoplasma* 252:359–371
93. Krenz B, Jeske H, Kleinow T (2012) The induction of stromule formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. *Front Plant Sci* 3:1–12
94. Hanson MR, Sattarzadeh A (2011) Stromules: Recent Insights into a Long Neglected Feature of Plastid Morphology and Function. *Plant Physiol* 155:1486–1492
95. Newell CA, Natesan SKA, Sullivan JA, Jouhet J, Kavanagh TA, Gray JC (2012) Exclusion of plastid nucleoids and ribosomes from stromules in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J* 69:399–410
96. Schattat MH, Griffiths S, Mathur N, Barton K, Wozny MR, Dunn N, Greenwood JS, Mathur J (2012) Differential Coloring Reveals That Plastids Do Not Form Networks for Exchanging Macromolecules. *Plant Cell* 24:1465–1477
97. Schattat MH, Klösgen RB, Mathur J (2012) New insights on stromules: stroma filled tubules extended by independent plastids. *Plant Signal Behav* 7:1132–7
98. Simkin AJ, Miettinen K, Claudel P, et al (2013) Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochemistry* 85:36–43
99. Caplan JL, Mamillapalli P, Burch-Smith TM, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP (2008) Chloroplastic Protein NRIP1 Mediates Innate Immune Receptor Recognition of a Viral Effector. *Cell* 132:449–462
100. Wang Q (2004) Deletion of the Chloroplast-Localized Thylakoid Formation1 Gene Product in *Arabidopsis* Leads to Deficient Thylakoid Formation and Variegated Leaves. *Plant Physiol* 136:3594–3604
101. Wang M, Rui L, Yan H, et al (2018) The major leaf ferredoxin Fd2 regulates plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol* 19:1377–1390
102. Aranda-Sicilia MN, Aboukila A, Armbruster U, Cagnac O, Schumann T, Kunz H-H, Jahns P, Rodríguez-Rosales MP, Sze H, Venema K (2016) Envelope K<sup>+</sup> /

- H<sup>+</sup> Antiporters AtKEA1 and AtKEA2 Function in Plastid Development. *Plant Physiol* 172:441–449
103. Bross CD, Howes TR, Rad SA, Kljakic O, Kohalmi SE (2017) Subcellular localization of Arabidopsis arogenate dehydratases suggests novel and non-enzymatic roles. *J Exp Bot* 68:1425–1440
  104. Lütz C, Bergweiler P, Di Piazza L, Holzinger A (2012) Cell Organelle Structure and Function in Alpine and Polar Plants are Influenced by Growth Conditions and Climate. In: *Plants Alp. Reg.* Springer Vienna, Vienna, pp 43–60
  105. Lütz C, Engel L (2007) Changes in chloroplast ultrastructure in some high-alpine plants: adaptation to metabolic demands and climate? *Protoplasma* 231:183–192
  106. Holzinger A, Buchner O, Lütz C, Hanson MR (2007) Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 230:23–30
  107. Buchner O, Holzinger A, Lütz C (2007) Effects of temperature and light on the formation of chloroplast protrusions in leaf mesophyll cells of high alpine plants. *Plant, Cell Environ* 30:1347–1356
  108. Lütz C (2010) Cell physiology of plants growing in cold environments. *Protoplasma* 244:53–73
  109. Zuñiga GE, Alberdi M, Corcuera LJ (1996) Non-structural carbohydrates in *Deschampsia antarctica* Desv. from South Shetland Islands, Maritime Antarctic. *Environ Exp Bot* 36:393–399
  110. Bravo LA, Griffith M (2005) Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants. *J Exp Bot* 56:1189–1196
  111. Olave-Concha N, Bravo LA, Ruiz-Lara S, Corcuera LJ (2005) Differential accumulation of dehydrin-like proteins by abiotic stresses in *Deschampsia antarctica* Desv. *Polar Biol* 28:506–513
  112. Zúñiga-Feest A, Bascuñán-Godoy L, Reyes-Díaz M, Bravo LA, Corcuera LJ (2009) Is survival after ice encasement related with sugar distribution in organs of the Antarctic plants *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) and

- Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae)? *Polar Biol* 32:583–591
113. Zúñiga-Feest A, Inostroza P, Vega M, Bravo LA, Corcuera LJ (2003) Sugars and enzyme activity in the grass *Deschampsia antarctica*. *Antarct Sci* 15:483–491
114. Piotrowicz-Ciespak A, Giełwanowska I, Bochenek A, Loro P, Gorecki RJ (2005) Carbonhydrates in *Colobanthus Quitensis* and *Deschampsia Antarctica*. *Acta Soc Bot Pol* 74:209–217
115. Huner N, Öquist G, Sarhan F (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci* 3:224–230
116. Luccini EA, Gallegos HG, Piacentini RD, Canziani PO (2006) Characterization of meteorological parameters, solar radiation and effect of clouds at two antarctic sites, and comparison with satellite estimates. *Meteorologica* 30:27–40
117. Pérez-Torres E, Bravo LA, Corcuera LJ, Johnson GN (2007) Is electron transport to oxygen an important mechanism in photoprotection? Contrasting responses from Antarctic vascular plants. *Physiol Plant* 130:185–194
118. Bravo LA, Saavedra-Mella FA, Vera F, Guerra A, Cavieres LA, Ivanov AG, Huner NPA, Corcuera LJ (2007) Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *J Exp Bot* 58:3581–3590
119. Bascuñán-Godoy L, García-Plazaola JI, Bravo LA, Corcuera LJ (2010) Leaf functional and micro-morphological photoprotective attributes in two ecotypes of *Colobanthus quitensis* from the Andes and Maritime Antarctic. *Polar Biol* 33:885–896
120. Bascuñán-Godoy L, Sanhueza C, Cuba M, Zúñiga GE, Corcuera LJ, Bravo LA (2012) Cold-acclimation limits low temperature induced photoinhibition by promoting a higher photochemical quantum yield and a more effective PSII restoration in darkness in the Antarctic rather than the Andean ecotype of *Colobanthus quitensis* Kunt Bartl (Cariophyllaceae). *BMC Plant Biol* 12:114
121. Perez-Torres E, Bravo LA, Corcuera LJ, Dinamarca J (2004) Responses of

- Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. to high light and low temperature. *Polar Biol* 27:183–189
122. Pérez-Torres E, García A, Dinamarca J, Alberdi M, Gutiérrez A, Gidekel M, Ivanov AG, Hüner NPA, Corcuera LJ, Bravo L (2004) The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of *Deschampsia antarctica*. *Funct Plant Biol* 31:731
  123. Bascuñán-Godoy L, Uribe E, Zúñiga-Feest A, Corcuera LJ, Bravo LA (2006) Low temperature regulates sucrose-phosphate synthase activity in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. by decreasing its sensitivity to Pi and increased activation by glucose-6-phosphate. *Polar Biol* 29:1011–1017
  124. Pérez-Torres E, Bascuñán L, Sierra A, Bravo LA, Corcuera LJ (2006) Robustness of activity of Calvin cycle enzymes after high light and low temperature conditions in Antarctic vascular plants. *Polar Biol* 29:909–916
  125. Xiong FS, Ruhland CT, Day TA (1999) Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. *Physiol Plant* 106:276–286
  126. Zanne AE, Tank DC, Cornwell WK, et al (2014) Three keys to the radiation of angiosperms into freezing environments. *Nature* 506:89–92
  127. Білявська НО, Подорванов ВВ, Федюк ОМ (2016) Сучасні уявлення про термогенез у рослин та його механізми. Вісник Харківського Національного аграрного університету: Серія Біологія 2:28–45
  128. Yamori W, Noguchi K, Hikosaka K, Terashima I (2010) Phenotypic Plasticity in Photosynthetic Temperature Acclimation among Crop Species with Different Cold Tolerances. *Plant Physiol* 152:388–399
  129. Meeuse BJD (1975) Thermogenic Respiration in Aroids. *Annu Rev Plant Physiol* 26:117–126
  130. Endress PK (1994) Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. *Cambridge Trop Biol Trop Biol Ser* 39:138
  131. Seymour RS, Schultze-Motel P (1996) Thermoregulating lotus flowers. *Nature* 383:305–305

132. Dieringer G, Cabrera R. L, Lara M, Loya L, Reyes- Castillo P (1999) Beetle Pollination and Floral Thermogenicity in *Magnolia tamaulipana* (Magnoliaceae). *Int J Plant Sci* 160:64–71
133. Stevens PF (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Missouri Bot Gard 1
134. Patiño S, Grace J, Bänziger H (2000) Endothermy by flowers of *Rhizanthese lowii* (Rafflesiaceae). *Oecologia* 124:149–155
135. Thien LB, Bernhardt P, Devall MS, Chen Z, Luo Y, Fan J, Yuan L, Williams JH (2009) Pollination biology of basal angiosperms (ANITA) grade. *Am J Bot* 96:166–182
136. Seymour RS, Maass E, Bolin JF (2009) Floral thermogenesis of three species of *Hydnora* (Hydnoraceae) in Africa. *Ann Bot* 104:823–832
137. Azuma H, Thien LB, Kawano S (1999) Floral scents, leaf volatiles and thermogenic flowers in Magnoliaceae. *Plant Species Biol* 14:121–127
138. Endress PK (2010) The evolution of floral biology in basal angiosperms. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:411–421
139. Seymour RS, Schultze-Motel P (1999) Respiration, temperature regulation and energetics of thermogenic inflorescences of the dragon lily *Dracunculus vulgaris* (Araceae). *Proc R Soc B Biol Sci* 266:1975–1983
140. Seymour RS, Schultze-Motel P, Lamprecht I (1998) Heat production by sacred lotus flowers depends on ambient temperature, not light cycle. *J Exp Bot* 49:1213–1217
141. Seymour RS (2004) Dynamics and precision of thermoregulatory responses of eastern skunk cabbage *Symplocarpus foetidus*. *Plant, Cell Environ* 27:1014–1022
142. Seymour RS, Gibernau M, Ito K (2003) Thermogenesis and respiration of inflorescences of the dead horse arum *Helicodiceros muscivorus*, a pseudo-thermoregulatory aroid associated with fly pollination. *Funct Ecol* 17:886–894
143. Wang R, Xu S, Liu X, Zhang Y, Wang J, Zhang Z (2014) Thermogenesis, flowering and the association with variation in floral odour attractants in *Magnolia sprengeri* (Magnoliaceae). *PLoS One* 9:1–8

144. Knutson RM (1979) Plants in heat. *Nat Hist* 88:42–47
145. Knutson RM (1974) Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage. *Science* (80- ) 186:746–747
146. Gibernau M, Barabé D, Cerdan P, Dejean A (1999) Beetle Pollination of *Philodendron solimoesense* (Araceae) in French Guiana. *Int J Plant Sci* 160:1135–1143
147. Seymour RS, Blaylock AJ (2000) Stigma peroxidase activity in association with thermogenesis in *Nelumbo nucifera*. *Aquat Bot* 67:155–159
148. Seymour RS (2010) Scaling of heat production by thermogenic flowers: Limits to floral size and maximum rate of respiration. *Plant, Cell Environ* 33:1474–1485
149. Seymour RS, Barnhart MC, Bartholomew GA (1984) Respiratory gas exchange during thermogenesis in *Philodendron selloum* Koch. *Planta* 161:229–232
150. Seymour RS, Bartholomew GA, Barnhart MC (1983) Respiration and heat production by the inflorescence of *Philodendron selloum* Koch. *Planta* 157:336–343
151. Lamprecht I, Seymour RS, Schultze-Motel P (1998) Direct and indirect calorimetry of thermogenic flowers of the sacred lotus, *Nelumbo nucifera*. *Thermochim Acta* 309:5–16
152. Ito-Inaba Y, Sato M, Masuko H, Hida Y, Toyooka K, Watanabe M, Inaba T (2009) Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*). *J Exp Bot* 60:3909–3922
153. Skubatz HL, Kunkel DD (2000) Developmental changes in the ultrastructure of the *Sauromatum guttatum* (Araceae) mitochondria. *Electron Microsc* 49:775–82
154. Скуклячев ВП (1989) Энергетика биологических мембран. Наука, Москва
155. Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363:100–124
156. Войников ВК, Корзун АМ (1984) Температура тканей побегов озимой пшеницы при холодовом шоке. Изв Сиб отд-ния АН СССР Сер биол наук

2:22–25

157. Bjorkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489–504
158. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF (2009) Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J Exp Biol* 212:2627–2634
159. Рогов АГ, Суханова ЕИ, Уральская ЛА, Аливердиева ДА, Звягильская РА (2014) Альтернативная Оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции. *Успехи биологической химии* 54:413–456
160. Vercesi AE, Borecký J, Maia I de G, Arruda P, Cuccovia IM, Chaimovich H (2006) Plant Uncoupling Mitochondrial Proteins. *Annu Rev Plant Biol* 57:383–404
161. Miller RE, Grant NM, Giles L, Ribas-Carbo M, Berry JA, Watling JR, Robinson SA (2011) In the heat of the night - alternative pathway respiration drives thermogenesis in *Philodendron bipinnatifidum*. *New Phytol* 189:1013–1026
162. Robson CA, Vanlerberghe GC (2002) Transgenic Plant Cells Lacking Mitochondrial Alternative Oxidase Have Increased Susceptibility to Mitochondria- Dependent and -Independent Pathways of Programmed Cell Death. *Plant Physiol* 129:1908–1920
163. Vanlerberghe G, Vanlerberghe CG (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int J Mol Sci* 14:6805–6847
164. Elthon TE, McIntosh L (1987) Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 84:8399–8403
165. Siedow JN, Umbach AL, Carolina N (1995) Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant Cell* 7:821–831
166. Moore AL, Umbach AL, Siedow JN (1995) Structure-function relationships of



- the alternative oxidase of plant mitochondria: A model of the active site. *J Bioenerg Biomembr* 27:367–377
167. Siedow JN, Umbach AL, Carolina N (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: Structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1459:432–439
168. Меденцев ИГ, Аринбасорова АЮ, Акименко ВК (1999) Регуляция и физиологическая роль цианидрезистентной оксидазы у грибов и растений. *Биохимия* 64:1457–1472
169. Medentsev AG, Arinbasarova AY, Golovchenko NP, Akimenko VK (2002) Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. *FEMS Yeast Res* 2:519–524
170. Kern A, Hartner FS, Freigassner M, Spielhofer J, Rumpf C, Leitner L, Fröhlich KU, Glieder A (2007) *Pichia pastoris* “just in time” alternative respiration. *Microbiology* 153:1250–1260
171. Juszczuk IM, Rychter AM (2003) Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 50:1257–1271
172. Vanlerberghe GC, Cvetkovska M, Wang J (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant* 137:392–406
173. Albury MS, Elliott C, Moore AL (2009) Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiol Plant* 137:316–327
174. Veiga A, Arrabaça JD, Loureiro-Dias MC (2003) Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res* 3:239–245
175. Kido Y, Sakamoto K, Nakamura K, et al (2010) Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei* brucei. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1797:443–450
176. Crichton PG, Albury MS, Affourtit C, Moore AL (2010) Mutagenesis of the *Sauromatum guttatum* alternative oxidase reveals features important for oxygen binding and catalysis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1797:732–737

177. Gupta KJ, Shah JK, Brotman Y, Jahnke K, Willmitzer L, Kaiser WM, Bauwe H, Igamberdiev AU (2012) Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *J Exp Bot* 63:1773–1784
178. Zubo YO, Potapova T V., Tarasenko VI, Börner T, Konstantinov YM (2014) The rate of transcription in *Arabidopsis* chloroplasts depends on activity of alternative electron transfer pathway in mitochondria. *Dokl Biochem Biophys* 455:76–79
179. Dojcinovic D, Krosting J, Harris AJ, Wagner DJ, Rhoads DM (2005) Identification of a region of the *Arabidopsis* AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Mol Biol* 58:159–175
180. Rhoads DM, McIntosh L (1992) Salicylic Acid Regulation of Respiration in Higher Plants: Alternative Oxidase Expression. *Plant Cell Online* 4:1131–1139
181. Ito K, Ogata T, Kakizaki Y, Elliott C, Albury MS, Moore AL (2011) Identification of a Gene for Pyruvate-Insensitive Mitochondrial Alternative Oxidase Expressed in the Thermogenic Appendices in *Arum maculatum*. *Plant Physiol* 157:1721–1732
182. Zhu Y, Lu J, Wang J, Chen F, Leng F, Li H (2011) Regulation of Thermogenesis in Plants: The Interaction of Alternative Oxidase and Plant Uncoupling Mitochondrial Protein. *J Integr Plant Biol* 53:7–13
183. Nevo E, Ordentlich A, Beiles A, Raskin I (1992) Genetic divergence of heat production within and between the wild progenitors of wheat and barley: evolutionary and agronomical implications. *Theor Appl Genet* 84–84:958–962
184. Vanlerberghe GC, McIntosh L (1997) ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:703–734
185. Saisho D, Nambara E, Naito S, Tsutsumi N, Hirai A, Nakazono M (1997) Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 35:585–596
186. Raskin I, Ehmann A, Melander WR, Meeuse BJD (1987) Salicylic Acid: A Natural Inducer of Heat Production in *Arum* Lilies. *Science* (80- ) 237:1601–

1602

187. Kapulnik Y, Yalpani N, Raskin I (1992) Salicylic Acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures. *Plant Physiol* 100:1921–6
188. Casolo V, Braidot E, Chiandussi E, MacRì F, Vianello A (2000) The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS Lett* 474:53–57
189. Шугаев АГ (1991) Некоторые особенности структурной организации и окислительной активности дыхательной цепи митохондрий растений. *Успехи современной биологии* 111:178–191
190. Ordentlich A, Linzer RA, Raskin I (1991) Alternative Respiration and Heat Evolution in Plants'. *Plant Physiol* 97:1545–1550
191. Moynihan MR, Ordentlich A, Raskin L (1995) Chilling-Induced Heat Evolution in Plants'. *Plant Physiol* 108:995–999
192. Грабельных ОИ (2005) Энергетические функции митохондрий растений в стрессовых условиях. *J Stress Physiol Biochem* 1:37–54
193. Грабельных ОИ, Побежимова ТП, Корзун АМ, Возненко СА, Королева НА, Павловская НС., Боровик ОА, Войников ВК (2011) Участие цианидрезистентного дыхания в термогенерации и антиокислительной защите клетки в проростках озимой пшеницы при холодовом воздействии. *Stress Physiol Biochem* 7:447–456
194. Войников ВК (2013) Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии. Наука, Новосибирск
195. Dar MI, Naikoo MI, Rehman F, Naushin F, Khan FA (2016) Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development. In: *Osmolytes Plants Acclim. to Chang. Environ. Emerg. Omi. Technol.* Springer India, New Delhi, pp 155–166
196. Kavi Kishor PB, Sreenivasulu N (2014) Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, Cell Environ* 37:300–311

197. Ashraf M, Akram NA, Al-Qurainy F, Foolad MR (2011) Drought Tolerance: Roles of Organic Osmolytes, Growth Regulators, and Mineral Nutrients. *Adv Agron* 111:249–296
198. Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012) Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signal Behav.* doi: 10.4161/psb.21949
199. Ma Q, Dai X, Xu Y, et al (2009) Enhanced Tolerance to Chilling Stress in OsMYB3R-2 Transgenic Rice Is Mediated by Alteration in Cell Cycle and Ectopic Expression of Stress Genes. *Plant Physiol* 150:244–256
200. Sakamoto A, Murata N (2000) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: Current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J Exp Bot* 51:81–88
201. Xing W, Rajashekar C. (2001) Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* 46:21–28
202. Park EJ, Jeknic Z, Chen THH (2006) Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. *Plant Cell Physiol* 47:706–714
203. Shirasawa K, Takabe T, Takabe T, Kishitani S (2006) Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Ann Bot* 98:565–571
204. Zhang S, Jiang H, Peng S, Korpelainen H, Li C (2011) Sex-related differences in morphological, physiological, and ultrastructural responses of *Populus cathayana* to chilling. *J Exp Bot* 62:675–686
205. Yoshikawa H, Honda C, Kondo S (2007) Effect of low-temperature stress on abscisic acid, jasmonates, and polyamines in apples. *Plant Growth Regul* 52:199–206
206. Kovácsa Z, Simon-Sarkadia L, Soványa C, Kirscha K, Galibab G, Kocsy G (2011) Differential effects of cold acclimation and abscisic acid on free amino acid composition in wheat. *Plant Sci J* 180:61–68
207. Cuevas JC, López-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A (2009) Putrescine as a signal to modulate

- the indispensable ABA increase under cold stress. *Plant Signal Behav* 4:219–220
208. Moradi Peynevandi K, Razavi SM, Zahri S (2018) The ameliorating effects of polyamine supplement on physiological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni under cold stress. *Plant Prod Sci* 21:123–131
209. Mollo L, Martins MCM, Oliveira VF, Nievola CC, de Figueiredo-Ribeiro RCL (2011) Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 107:141–149
210. Folgado R, Panis B, Sergeant K, Renaut J, Swennen R, Hausman JF (2013) Differential protein expression in response to abiotic stress in two potato species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. *Int J Mol Sci* 14:4912–4933
211. Sanchez-Bel P, Egea I, Sanchez-Ballesta MT, Sevillano L, Del Carmen Bolarin M, Flores FB (2012) Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic processes and protein degradation machinery. *Plant Cell Physiol* 53:470–484
212. Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63:1593–1608
213. Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiol* 52:1569–1582
214. Klotke J, Kopka J, Gatzke N, Heyer AG (2004) Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of. *Plant, Cell Environ* 27:1395–1404
215. Rohde P, Hinch DK, Heyer AG (2004) Heterosis in the freezing tolerance of crosses between two *Arabidopsis thaliana* accessions (Columbia-0 and C24) that show differences in non-acclimated and acclimated freezing tolerance. *Plant J* 38:790–799

216. Kamata T, Uemura M (2004) Solute Accumulation in Wheat Seedlings During Cold Acclimation : *Cryo-Letters* 25:311–322
217. Tabaei-Aghdai SR, Pearce RS, Harrison P (2003) Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *J Exp Bot* 54:1565–1575
218. Huang J (2000) Genetic Engineering of Glycinebetaine Production toward Enhancing Stress Tolerance in Plants: Metabolic Limitations. *Plant Physiol* 122:747–756
219. Sasaki H, Ichimura K, Oda M (1996) Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Ann Bot* 78:365–369
220. Gerhardt R, Heldt HW (1984) Freeze-Stopped Material. *J Biol Chem* 14:542–547
221. Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F (2001) Photoperiod and Temperature Interactions Regulate Low-Temperature-Induced Gene Expression in Barley. *Plant Physiol* 127:1676–1681
222. Zhu J, Dong CH, Zhu JK (2007) Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol* 10:290–295
223. Li H-W, Zang B-S, Deng X-W, Wang X-P (2011) Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234:1007–1018
224. Kawakami A, Sato Y, Yoshida M (2008) Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *J Exp Bot* 59:793–802
225. Pennycooke JC (2003) Down-Regulating  $\alpha$ -Galactosidase Enhances Freezing Tolerance in Transgenic Petunia. *Plant Physiol* 133:901–909
226. Артющенко ЗТ (1970) Амариллисовые СССР: морфология, систематика и использование. Наука, Ленинград, Россия
227. Mosyakin SL, Buyun L (2014) Проблема Asparagales sensu APG: Сучасні погляди на макросистематику ключової групи однодольних. Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришко, Київ

228. Berkov S, Cuadrado M, Osorio E, Viladomat F, Codina C, Bastida J (2009) Three new alkaloids from *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii*. *Planta Med* 75:1351–1355
229. (2018) Червона книга рослин України. <http://redbook-ua.org/item/galanthus-nivalis-l/>.
230. Berkov S, Codina C, Bastida J (2012) The *Genus Galanthus*: A Source of Bioactive Compounds. *Phytochem - A Glob Perspect role Nutr Heal* 235–254
231. Kim JK, Park SU (2017) Pharmacological aspects of galantamine for the treatment of Alzheimer's disease. *EXCLI J* 16:35–39
232. Naharci MI, Ozturk A, Yasar H, Cintosun U, Kocak N, Bozoglu E, Tasci I, Doruk H (2015) Galantamine improves sleep quality in patients with dementia. *Acta Neurol Belg* 115:563–568
233. Wu L, Bao JK (2013) Anti-tumor and anti-viral activities of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)-related lectins. *Glycoconj J* 30:269–279
234. Akkouch O, Ng TB, Singh SS, Yin C, Dan X, Chan YS, Pan W, Cheung RCF (2015) Lectins with anti-HIV activity: A review. *Molecules* 20:648–668
235. Macedo M, Oliveira C, Oliveira C (2015) Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules* 20:2014–2033
236. Bokov DO, Malinkin AD, Samylina IA, Bessonov VV (2017) Hydroxycinnamic and organic acids of snowdrops (*Galanthus L.*). *J Appl Pharm Sci* 7:036–040
237. (2017) Архів погоди у Рівненській області. [http://rp5.ua/Погода\\_в\\_Ровно,\\_Украина](http://rp5.ua/Погода_в_Ровно,_Украина). Accessed 2 Jan 2017
238. Федюк ОМ, Білявська НО (2015) Ультроструктурні зміни мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. при вегетації за умов гіпотермії. *Вісник Харківського Національного аграрного університету: Серія Біологія* 2(35):58–63
239. Fluke C (2009) Введение в термографию, Fluke Corp. American Technical Publishers, USA
240. Федюк ОМ (2017) Пристрій для моніторингу температури листків рослин

- та фізико-кліматичних показників атмосферного повітря і ґрунту / Промислова власність “Винаходи. Корисні моделі. Топографії інтегральних мікросхем”, офіційний бюлетень №11, книга 1, ПАТЕНТ №117136. 1–5
241. Федюк ОМ, Поліщук ОВ, Білявська НО (2016) Динаміка змін інтенсивності дихання листків *Galanthus nivalis* (*Amaryllidaceae*) за різних значень низької температури і вологості повітря. Український ботанічний журнал 73:283–289
242. Topchiy NM, Sytnik SK, Syvash OO, Zolotareva OK (2005) The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. *Photosynthetika* 43(3):451–456
243. Поліщук ОВ (2017) Методи польових і лабораторних досліджень флуоресценції хлорофілу. Український ботанічний журнал 74(1):86–93
244. Корнеев ДЮ (2002) Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Альтерпрес
245. Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668
246. 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
247. Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 990:87–92
248. Björkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489–504
249. Руденко ВМ (2012) Математична статистика. Центр учбової літератури, Київ
250. Baxter B (2013) Plant acclimation and adaptation to warm environments. In: Keara a. Franklin Philip a. Wigge (ed) *Temp. Plant Dev.* John Wiley & Sons,



- Inc, Oxford, pp 49–78
251. Hetherington AM, Woodward FI (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424:901–908
252. Scepankova I, Hudák J, Hudak J (2004) Leaf and tepal anatomy , plastid ultrastructure and chlorophyll content in *Galanthus nivalis* L. and *Leucojum aestivum* L. *Plant Syst Evol* 243:211–219
253. Недуха ОМ (2015) Клітинна оболонка рослин і фактори середовища. Київ
254. Михеенко АВ (2018) Геометрическая оптика. Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, Хабаровск, Россия
255. Nishio JN, Sun J, Vogelmann TC (1994) Photoinhibition and the light environment within leaves. In: 41st Harden Conf. Photoinhibition Photosynth. from Mol. Mech. to field. *Environ. PLANT Biol.* BIOS Scientific Publishers, Ashford, pp 221–238
256. Седельникова ЛЛ (2014) Анатомическое строение эпидермы листа у растений семейства Hyacinthaceae и Liliaceae. *Почвообразование и растениеводство* 4:132–136
257. Özdemir C, Alcipete E (2010) Morphological and Anatomical Study on *Galanthus Gracilis* (AMARYLLIDACEAE). *Acta Bot Hung* 52:151–157
258. Fahn A (1990) Plant Anatomy. *Esau's Plant Anat.* doi: 10.1002/0470047380.ch8
259. Білявська НО, Федюк ОМ (2018) Мікроструктура поверхні листків *Galanthus nivalis* L. на ранньовесняних етапах розвитку. *Вісник Харківського Національного аграрного університету: Серія Біологія* 2:50–58
260. Мирославов ЕА (1974) Структура и функция эпидермиса листа покрытосеменных растений. Наука, Ленинград
261. Vokov DO, Samylina IA, Nikolov SD (2017) Macroscopic and Microscopic Evaluation of *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Galanthus nivalis* L. Homeopathic Crude Herbal Drugs. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 9:58–64
262. Budnikov G (2011) Morphological variation of specimens and populations of

- Galanthus nivalis* L. in western regions of Ukraine. *Thaiszia J Bot* 21:95–110
263. Beaulieu JM, Leitch IJ, Patel S, Pendharkar A, Knight CA (2008) Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytol* 179:975–986
264. Bucher SF, Auerswald K, Grün-Wenzel C, Higgins SI, Garcia Jorge J, Römermann C (2017) Stomatal traits relate to habitat preferences of herbaceous species in a temperate climate. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 229:107–115
265. Aasamaa K, Söber A, Rahi M (2001) Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. *Funct Plant Biol* 28:765
266. Kerstiens G (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *J Exp Bot* 47:1813–1832
267. Машевська АС, Єрмейчук ТМ (2015) Фізіологія та біохімія рослин: матеріали для опрацювання теми «Водний режим рослин» з курсу «Фізіологія та біохімія рослин». Вежа-Друк, Луцьк
268. Valeska Zeisler-Diehl V, Migdal B, Schreiber L (2017) Quantitative characterization of cuticular barrier properties: methods, requirements, and problems. *J Exp Bot* 68:5281–5291
269. Fernández V, Guzmán-Delgado P, Graça J, Santos S, Gil L (2016) Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front Plant Sci* 7:1–14
270. Elpe C, Knopf P, Stützel T, Schulz C (2018) Diversity and evolution of leaf anatomical characters in Taxaceae s.l.-fluorescence microscopy reveals new delimitating characters. *J Plant Res* 131:125–141
271. Guzman P, Fernandez V, Graasa J, Cabral V, Kayali N, Khayet M, Gil L (2014) Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. *Front Plant Sci* 5:481
272. Buschhaus C, Jetter R (2011) Composition differences between epicuticular and

- intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *J Exp Bot* 62:841–853
273. Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* 13:236–246
274. Koch K, Neinhuis C, Ensikat HJ, Barthlott W (2004) Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). *J Exp Bot* 55:711–718
275. Reynhardt EC, Riederer M (1994) Structures and molecular dynamics of plant waxes - II. Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. *Eur Biophys J* 23:59–70
276. Weryszko-Chmielewska E, Chwil M (2016) Flowering biology and structure of floral nectaries in *Galanthus nivalis* L. *Acta Soc Bot Pol* 85:1–20
277. Körner C (2016) Plant adaptation to cold climates. *F1000Research* 5:1–5
278. Nagelmüller S, Hiltbrunner E, Körner C (2016) Critically low soil temperatures for root growth and root morphology in three alpine plant species. *Alp Bot* 126:11–21
279. Aschan G, Pfanz H (2006) Why Snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) tepals have green marks? *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 201:623–632
280. Rejšková A, Brom J, Pokorný J, Korečko J (2010) Temperature distribution in light-coloured flowers and inflorescences of early spring temperate species measured by Infrared camera. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 205:282–289
281. Giełwanowska I, Pastorczyk M, Kellmann-Sopyła W, Górniak D, Górecki RJ (2015) Morphological and Ultrastructural Changes of Organelles in Leaf Mesophyll Cells of the Arctic and Antarctic Plants of Poaceae Family Under Cold Influence. *Arctic, Antarct Alp Res* 47:17–25
282. Stefanowska M, Kuraś M, Kacperska A (2002) Low Temperature-induced Modifications in Cell Ultrastructure and Localization of Phenolics in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) Leaves. *Ann Bot* 90:637–645
283. Ristic Z, Ashworth EN (1993) Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates

- in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma* 172:111–123
284. Armstrong AF, Logan DC, Tobin AK, O'Toole P, Atkin OK (2006) Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell Environ* 29:940–949
285. Logan DC, Leaver CJ (2000) Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot* 51:865–871
286. Yoshinaga K, Arimura SI, Niwa Y, Tsutsumi N, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2005) Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 96:337–342
287. Soubannier V, McBride HM (2009) Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1793:154–170
288. Fediuk OM, Bilyavska NO, Zolotareva EK (2018) Effects of soil early-spring temperature on the morphometric parameters of mitochondria in *Galanthus nivalis* L. leaves. *Plant Sci Today* 5:149–154
289. Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA (2011) Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:79–104
290. Azcón-Bieto J, Murillo J, Peñuelas J (1987) Cyanide-resistant respiration in photosynthetic organs of freshwater aquatic plants. *Plant Physiol* 84:701–6
291. Stupnikova I (2005) Pea Seed Mitochondria Are Endowed with a Remarkable Tolerance to Extreme Physiological Temperatures. *PLANT Physiol* 140:326–335
292. Шугаев АГ, Генерозова ИП, Шугаева НА, Выскребенцева ЭИ (2008) Метаболическая активность митохондрий растений в гипертонических растворах сахарозы. *Физиология растений* 55:374–380
293. Генерозова ИП, Маевская СН, Шугаев АГ (2009) Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков

- гороха, подвергнутых водному стрессу. Физиология растений 56:45–52
294. Leprince O, Harren FJM, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA (2000) Metabolic Dysfunction and Unabated Respiration Precede the Loss of Membrane Integrity during Dehydration of Germinating Radicles. *Plant Physiol* 122:597–608
295. Schmitt N, Dizengremel P (1989) Effect of osmotic stress on mitochondria isolated from etiolated mung bean and sorghum seedlings. *Plant Physiol Biochem* 27:17–26
296. Лукаткин АС (2005) Инициация и развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Физиология растений 4:608–613
297. Лазарева ЕМ, Ченцов ЮС, Смирнова ЕА (2008) Влияние низкой температуры на системы микротрубочек в клетках корневой системы ярового и озимого сортов пшеницы *Triticum aestivum* L. Цитология 50:597–612
298. Венжик ЮВ, Титов АФ, Таланова ВВ, Мирославов ЕА, Котеева НК (2012) Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодовой адаптации. Цитология 54:916–924
299. Смашевский НД (2014) Экология фотосинтеза. Астраханский вестник экологического образования 2(28):165–180
300. Лукаткин АС (2003) Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Повреждение клеточных мембран при охлаждении теплолюбивых растений. Физиология растений 50:271–274
301. Белозерова АА, Новикова ПН (2010) Влияние дефицита влаги на изменчивость количественных признаков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). In: Успехи современного естествознания. Тюмень, p 19
302. Радюк МС, Доманская ИН, Щербаков РА, Шальго НВ (2010) Влияние низкотемпературного стресса на содержание дегидринов и шаперона БТШ70 в зеленых проростках ячменя (*Hordeum vulgare*). Вестник Национальной академии наук Беларуси 4:75–79
303. Колупаев ЮЕ, Рябчун НИ, Вайнер АА, Ястреб ТО, Обозный АИ (2015)

- Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе. Физиология растений 62:499–506
304. Боровик ОА, Грабельных ОИ, Королева НА, Побежимова ТП, Войников ВК (2013) Связь между активностью альтернативного пути дыхания, содержанием сахаров и морозоустойчивостью озимой пшеницы. J Stress Physiol Biochem 9:115–121
305. Гармаш ЕВ (2010) Альтернативный путь дыхания в растениях: регуляция и функции. Известия Коми научного центра УрО РАН 3:26–31
306. Lambers H, Day DA, Azcón-Bieto J (1983) Cyanide-resistant respiration in roots and leaves. Measurements with intact tissues and isolated mitochondria. Physiol Plant 58:148–154
307. Федюк ОМ, Білявська НО, Золотарьова ОК (2017) Ультроструктурні особливості та стан фотосинтетичного апарату листків *Galanthus nivalis* (*Amaryllidaceae*) на весняних етапах онтогенезу. Український ботанічний журнал 74:475–487
308. Мамушина НС, Вознесенская ЕВ, Зубкова ЕК, Маслова ТГ, Мирославов ЕА (2002) Структурно-функциональные изменения клеток мезофилла в процессе роста листа у двух ранневесенних эфемероидов. Физиология растений 49:171–178
309. Kratsch HA, Wise RR (2000) The ultrastructure of chilling stress. Plant, Cell Environ 23:337–350
310. Biswal B (1997) Chloroplast pigments and molecular responses of photosynthesis under stress. New York
311. Van der Toorn A, Zemah H, Van As H, Bendel P, Kamenetsky R (2000) Developmental changes and water status in tulip bulbs during storage: visualization by NMR imaging. J Exp Bot 51:1277–87
312. Мирославов Е.А. БЕМ (2005) Сезонная ритмика структуры лейкопластов чешуй луковицы *Scilla sibirica* L. Цитология 47:1035–1038
313. Wise RR, McWilliam JR, Naylor AW (1983) A comparative study of low-

- temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. *Plant, Cell Environ* 6:525–535
314. Krall JP, Edwards GE (1992) Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Physiol Plant* 86:180–187
315. Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668
316. Корнеев ДЮ, Нижник ТП, Григорюк ИА, Кочубей СМ (2002) Индукция флуоресценции хлорофилла листьев картофеля в условиях водного дефицита. *Физиол биохим культур раст* 34:3–10
317. Tu W, Li Y, Zhang Y, Zhang L, Liu H, Liu C, Yang C (2012) Diminished photoinhibition is involved in high photosynthetic capacities in spring ephemeral *Berberoa incana* under strong light conditions. *J Plant Physiol* 169:1463–1470
318. Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 990:87–92
319. Мамушина НС, Зубкова ЕК, Буболо ЛС, Тютерева ЕВ (2011) Структурно-функциональная характеристика эфемероидов бореальной зоны. *Ботанический журнал* 96:906–916
320. Recchia I, Sparla F, Pupillo P (2017) Photosynthetic properties of spring geophytes assessed by chlorophyll fluorescence analysis. *Plant Physiol Biochem* 118:510–518
321. Sparling J. H. (2017) Assimilation Rates of Some Woodland Herbs in Ontario. *Bot Gaz* 128:160–168
322. Hikosaka K (2004) Leaf Canopy as a Dynamic System: Ecophysiology and Optimality in Leaf Turnover. *Ann Bot* 95:521–533
323. Olekseichenko N, Kitaev O, Sovakova O, Sovakov O, Borhschevskiy M (2013) Features of the induction of chlorophyll fluorescence in leaves of woody plants in urban environment. *Biol Resour Nat Manag* 5:107–112
324. Fernández AP, Strand Å (2008) Retrograde signaling and plant stress: plastid

- signals initiate cellular stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 11:509–513
325. Uemura M, Steponkus PL (2003) Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell Environ* 26:1083–1096
326. Koleva DP, Ganeva TG, Stefanova MA (2012) Effect of Cryoprotectants Sucrose and ABA on Chloroplasts Structure in Regenerated After Cryopreservation *Orthosiphon stamineus* Benth. *Plants*. 5:4172–4174
327. Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in. 414–427
328. Koster KL, Lynch D V (1992) Solute Accumulation and Compartmentation During the Cold-Acclimation of Puma Rye. *Plant Physiol* 98:108–113
329. Shao HB, Guo QJ, Chu LY, Zhao XN, Su ZL, Hu YC, Cheng JF (2007) Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 54:37–45
330. Дерябин АН, Сабельникова ЕП, Бураханова ЕА (2011) Зависимость формирования холодоустойчивости у растений *in vitro* от концентрации сахарозы в среде выращивания. *Вестник Мордовского университета* 4:200–206
331. Bowers MC (1994) Environmental effects of cold on plants. In: Wilkinson R (ed) *Plant-Environment Interact.* New York, pp 391–411
332. Fediuk OM, Bilyavska NO, Zolotareva OK (2017) Effects of sucrose on structure and functioning of photosynthetic apparatus of *Galanthus nivalis* L. leaves exposed to chilling stress. *Ann Rom Soc Cell Biol* XXI:43–51
333. Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571–99
334. Wanner LA, Junttila O (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120:391–400
335. Ristic Z, Ashworth EN (1993) Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation.



- Protoplasma 172:111–123
336. Shao HB, Chu LY, Shao MA, Zhao CX (2008) Advances in functional regulation mechanisms of plant aquaporins: Their diversity, gene expression, localization, structure and roles in plant soil-water relations (Review). *Mol Membr Biol* 25:179–191
337. Örvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS, Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J* 23:785–794
338. Yuanyuan M, Yali Z, Jiang L, Hongbo S (2010) Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *J Biotechnol* 8:2004–2010
339. Pechová R, Kutík J, Dana H, Viánková A (2003) The Ultrastructure of Chloroplasts, Content of Photosynthetic Pigments, and Photochemical Activity of Maize (*Zea mays* L.) as Influenced by Different Concentrations of the Herbicide Amitrole. *Photosynthetica* 41:127–136
340. Krall JP, Edwards GE (1992) Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Physiol Plant* 86:180–187
341. Моргун В, Майор П (2009) Зимо- і морозостійкість озимих злакових культур. In: Фізіологія рослин Проблеми та перспективи розвитку. Логос, Київ, pp 105–165
342. Колупаев ЮЕ, Горелова ЕИ, Ястреб ТО (2008) Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы. Вісник Харківського Національного аграрного університету: Серія Біологія 1:6–33
343. Іващенко ОО (2008) Шляхи адаптації землеробства в умовах змін клімату. Збірник наукових праць Національного наукового центру “Інститут землеробства НААН” Спец. Вип.:15–21
344. Evert RF (2006) *Esau’s Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*, 3rd. doi: 10.1002/0470047380
345. Eamus D, Taylor DT, Macinnis-Ng СМО, Shanahan S, De Silva L (2008)

- Comparing model predictions and experimental data for the response of stomatal conductance and guard cell turgor to manipulations of cuticular conductance, leaf-to-air vapour pressure difference and temperature: Feedback mechanisms are able to account for. *Plant, Cell Environ* 31:269–277
346. Domec J-C, Noormets A, King GS, Steven GM, Gavazzi MJ, Boggs JL, Treasure EA (2009) Decoupling the influence of leaf and root hydraulic conductances on stomatal conductance and its sensitivity to vapour pressure deficit as soil dries in a drained loblolly pine plantation. *Plant, Cell Environ* 32:980–991
347. Searle SY, Thomas S, Griffin KL, Horton T, Kornfeld A, Yakir D, Hurry V, Turnbull MH (2011) Leaf respiration and alternative oxidase in field-grown alpine grasses respond to natural changes in temperature and light. *New Phytol* 189:1027–1039
348. Umbach AL, Lacey EP, Richter SJ (2009) Temperature-sensitive alternative oxidase protein content and its relationship to floral reflectance in natural *Plantago lanceolata* populations. *New Phytol* 181:662–671
349. Campbell C, Atkinson L, Zaragoza-Castells J, Lundmark M, Atkin O, Vaughan H (2007) Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol* 176:375–389
350. Armstrong AF, Badger MR, Day DA, Barthelet MM, Smith PMC, Millar AH, Whelan J, Atkin OK (2008) Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration. *Plant, Cell Environ* 31:1156–1169
351. Fiorani F (2005) The Alternative Oxidase of Plant Mitochondria Is Involved in the Acclimation of Shoot Growth at Low Temperature. A Study of *Arabidopsis* AOX1a Transgenic Plants. *Plant Physiol* 139:1795–1805
352. Климчук ДО, Косаківська ІВ, Акімов ЮМ, Щербатюк ММ, Воробйова ТВ (2011) Структурно-функціональні особливості клітин листків суріпиці озимої та щиріці хвостатої за умов короткочасної дії низької позитивної

- температури. Вісник Харківського Національного аграрного університету: Серія Біологія 3:15–24
353. Pastorczyk M, Giełwanowska I, Lahuta LB (2014) Changes in soluble carbohydrates in polar Caryophyllaceae and Poaceae plants in response to chilling. *Acta Physiol Plant* 36:1771–1780
354. Delfosse K, Wozny MR, Barton KA, Mathur N, Griffiths N, Mathur J (2018) Plastid Envelope-Localized Proteins Exhibit a Stochastic Spatiotemporal Relationship to Stromules. *Front Plant Sci* 9:1–12
355. Barton KA, Wozny MR, Mathur N, Jaipargas E-A, Mathur J (2017) Chloroplast behaviour and interactions with other organelles in *Arabidopsis thaliana* pavement cells. *J Cell Sci* jcs.202275
356. Benina M, Obata T, Mehterov N, Ivanov I, Petrov V, Toneva V, Fernie AR, Gechev TS (2013) Comparative metabolic profiling of *Haberlea rhodopensis*, *Thellungiella halophylla*, and *Arabidopsis thaliana* exposed to low temperature. *Front Plant Sci* 4:1–11
357. Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Poree F, Höhne M, Günter M, Trethewey R, Kamlage B, Poorter H, Stitt M (2008) Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant, Cell Environ* 31:518–547
358. Purdy SJ, Maddison AL, Jones LE, Webster RJ, Andralojc J, Donnison I, Clifton-Brown J (2013) Characterization of chilling-shock responses in four genotypes of *Miscanthus* reveals the superior tolerance of *M. × giganteus* compared with *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*. *Ann Bot* 111:999–1013
359. Lundmark M, Cavaco AM, Trevanion S, Hurry V (2006) Carbon partitioning and export in transgenic *Arabidopsis thaliana* with altered capacity for sucrose synthesis grown at low temperature: A role for metabolite transporters. *Plant, Cell Environ* 29:1703–1714
360. Van Den Bogaart G, Hermans N, Krasnikov V, De Vries AH, Poolman B (2007) On the decrease in lateral mobility of phospholipids by sugars. *Biophys*

J 92:1598–1605

361. Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Van Den Ende W, Cuypers A (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. *Plant, Cell Environ* 36:1242–1255

## ДОДАТОК А

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ

## Наукові статті

1. **Федюк ОМ**, Білявська НО (2015) Ультраструктурні зміни мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. при вегетації за умов гіпотермії. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(35): 58-63. *(Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавтором написано статтю).*

2. Білявська НО, Подорванов ВВ, **Федюк ОМ** (2016) Сучасні уявлення про термогенез у рослин та його механізми. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(38): 28-45. *(Здобувачем здійснено аналіз даних літератури і взято участь у підготовці статті до друку).*

3. **Федюк ОМ**, Поліщук ОВ, Білявська НО (2016) Динаміка змін інтенсивності дихання листків *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) за різних значень низької температури і вологості повітря. Укр бот журн 73(3): 283-289. [doi.org/10.15407/ukrbotj73.03.283](https://doi.org/10.15407/ukrbotj73.03.283). *(Здобувачем проведено разом із співавторами дослідження, опрацьовано експериментальні дані та написано статтю).*

4. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Золотарьова ОК (2017) Ультраструктурні особливості та стан фотосинтетичного апарату листків *Galanthus nivalis* L. на весняних етапах онтогенезу. Укр бот журн 74(5): 475-487. [doi.org/10.15407/ukrbotj74.05.475](https://doi.org/10.15407/ukrbotj74.05.475) *(Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавторами написано статтю).*

5. **Fediuk OM**, Bilyavska NO, Zolotareva OK (2017) Effects of sucrose on structure and functioning of photosynthetic apparatus of *Galanthus nivalis* L. leaves exposed to chilling stress. Annals Society for Cell Biol XXI(3): 43-51.

doi: [10.ANN/RSCB-2018-0002:RSCB](https://doi.org/10.ANN/RSCB-2018-0002:RSCB) (Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавторами написано статтю).

6. Білявська НО, **Федюк ОМ** (2018) Мікроструктура поверхні листків *Galanthus nivalis* L. на ранньовесняних етапах розвитку. Вісн Харків нац аграрн ун-ту Сер Біологія 2(44): 50-58. (Здобувачем спільно з співавтором проведено дослідження, взято участь в опрацюванні експериментальних даних та написанні статті).

7. **Fediuk OM**, Bilyavska NO, Zolotareva EK (2018) Effects of soil early-spring temperature on the morphometric parameters of mitochondria in *Galanthus nivalis* L. leaves. Plant Science Today 5(4): 149-154.

[dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.4.405](https://doi.org/10.14719/pst.2018.5.4.405) (Здобувачем самотійно проведено дослідження, опрацьовано експериментальні дані та спільно зі співавторами написано статтю).

### Патент України на корисну модель

**Федюк ОМ** (2017) винахідник; Пристрій для моніторингу температури листків рослин та фізико-кліматичних показників атмосферного повітря і ґрунту. Промислова власність “Винаходи. Корисні моделі. Топографії інтегральних мікросхем”. Патент №117136. 12 червня 2017.

### Тези конференцій

1. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Поліщук ОВ (2014) Вплив ціаніду і саліцилгідроксамової кислоти на активність дихання листків *Galanthus nivalis* L. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 9-12 вересня 2014; Україна. Умань. С. 115.

2. **Федюк ОМ**, Білявська НО (2015) Вплив низьких температур на ультраструктуру мітохондрій листків *Galanthus nivalis* L. Збірник наукових праць VI Науково-практичної конференції “Біологічні дослідження – 2015”; 11-12 березня 2015; Україна. Житомир. С. 46.

3. **Федюк ОМ**, Белявська НА, Полищук АВ (2015) Динамика дыхания листьев *Galanthus nivalis* L. под воздействием температуры и влажности внешней среды. Материалы V съезда биофизиков России; 4-10 октября 2015; Россия. Ростов-на-Дону; Т1. С. 379.

4. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Поліщук ОВ (2015) Динаміка тканинного дихання листків *Galanthus nivalis* L. в період вегетації. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 15-20 вересня 2015; Україна. Полтава. С. 119.

5. **Fediuk OM**, Polishuk OV, Bilyavska NO (2016) The effect of low growth temperature on the intensity of respiration and photosynthetic parameters in *Galanthus nivalis* L. (*Amaryllidaceae*) leaves. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 29 червня 2016; Україна. Херсон. С. 112.

6. **Федюк ОМ**, Білявська НО, Золотарьова ОК (2017) Вплив деяких абіотичних факторів на динаміку температури листків *Galanthus nivalis* L. в природних умовах. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 5-10 вересня 2017; Україна. Луцьк. С. 91.

7. **Fediuk OM**, Bilyavska NO (2017) Qualitative and quantitative changes in chloroplasts of *Galanthus nivalis* L. on spring stages of ontogenesis. Moderating methodologicies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences; 2017 December 27-28; Poland. Lublin. P. 201-204.

8. **Fediuk OM**, Bilyavska NO, Zolotareva OK (2018) Grana's structure in mesophyll of leaves *Galanthus nivalis* L. under the exogenous sucrose and low temperatures influence. Матеріали міжнародної конференції молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”; 2-5 вересня 2018; Україна. Кирилівка. С. 89.

9. **Fediuk OM** (2018) Influence of Spring Temperatures and Soil Humidity on Leaves Temperature *Galanthus nivalis* L. in the Natural Environment. VII International correspondence scientific specialized conference “International

Scientific Review of the Problems of Natural Sciences and Medicine”; 2018 October 2-3; USA. Boston. P. 19-23.



## ДОДАТОК Б

