

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

ФЕДЮК ОЛЬГА МИРОНІВНА



УДК 581.174:576.311.347:582.573.21:58.036.5

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі мембранології та фітохімії Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, м. Київ

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Білявська Нінель Олександрівна,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
НАН України, провідний науковий
співробітник відділу мембранології та фітохімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Кравець Олена Адольфівна,
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», провідний науковий
співробітник відділу геноміки
та молекулярної біотехнології

доктор біологічних наук, професор
Колупаєв Юрій Євгенович,
Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва
Міністерства освіти і науки України,
завідувач кафедри ботаніки і фізіології рослин

Захист відбудеться « 24 » червня 2019 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел. (044) 343 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел. (044) 343 37 77

Автореферат розісланий « » травня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Інтенсивний розвиток промисловості та збільшення антропогенного навантаження на природне середовище спричиняють 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 (Nelson et al., 2014). 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 (Мельник, Діденко, 2013; Будніков, 2017). У наукових працях, присвячених проблемі холодостійкості рослин (Millar, 2011; Vanlerberghe, 2013), 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 А₂; 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 (Войников, 2018; Kenchanmane et al., 2018). 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 (Kratsch, Wise, 2000), 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 (Zoldan et al., 2012). 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 (ФСІІ) (Yang et al., 2017). 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 (ФСА) (Zhang et al., 2014). Відомо, що високий вміст розчинних вуглеводів в клітинах характерний для зимуючих або акліматизованих до холоду рослин (Krasensky-Wrzaczek, Jonak, 2012). 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 CO₂” (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: трансмісійна електронна мікроскопія, світлова мікроскопія, сканувальна електронна мікроскопія, морфометрія, полярографія, індукція флуоресценції хлорофілу, спектрометрія теплового електромагнітного випромінювання, методи варіаційної статистики.

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

листіків *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 – у 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У огляді літератури розглянуто структурні і функціональні особливості мітохондрій та хлоропластів рослин, показано їх роль в диханні і фотосинтезі. Наведено дані про вплив низьких температур на структуру і функціонування мітохондрій та хлоропластів рослин. Для підтвердження робочої гіпотези проаналізовано шляхи адаптації рослин до низьких температур і подано загальну характеристику деяких з них, зокрема, ціанід-резистентне дихання, виділення тепла і застосування кріопротекторів. На основі даних огляду літератури виявлено недостатність вивчення ролі структурних змін в адаптації дихання і фотосинтезу ефемероїдів до низьких температур та обґрунтовано актуальність і завдання дослідження за темою дисертаційної роботи.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженнях використовувались рослини *G. nivalis*, які розвивались в природних умовах у відкритому ґрунті на ділянках Моквинського лісництва Костопільського району Рівненської області. З рослин відбирали листки після появи їх на поверхні ґрунту, на вегетативному і генеративному етапах розвитку рослин.

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. Температура атмосферного повітря підтримувалась в межах плюсових значень 22-23 °С, а відносна вологість ґрунту 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 мкмоль фотонів • м⁻² • с⁻¹). Загартування здійснювали експозицією рослин за низьких плюсових температур (+5 °С вдень і +3 °С вночі) протягом 14 діб з 8-годинним фотоперіодом при низькому штучному освітленні (80 мкмоль фотонів • м⁻² • 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 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 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.

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 на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2) та 1% OsO₄ на 0,1 М какодилатному буфері (рН 7,2). Матеріал зневоднювали в серії спиртів та пропіленоксиду, просочували сумішшю епоксидних смол з пропіленоксидом, а потім заливали епон-аралдитною смолою за стандартною методикою. Полімеризацію смоли проводили при температурі 37 і 60 $^{\circ}\text{C}$. Ультратонкі зрізи листків отримували і на ультрамікроскопі LKB-V (LKB, Швеція), контрастували 1% розчином ураніацетату та розчином цитрату свинцю. Препарати досліджували у трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1300 (JEOL, Японія) за напруги 80 кВ. Ультраструктуру клітин 2-го шару мезофілу листків фотографували при збільшенні в 10000, 15000 та 100000 разів.

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).

Світлова мікроскопія. Зі зразків листків, фіксованих для електронно-мікроскопічних досліджень, виготовляли напівтонкі поперечні зрізи (0,5-1,0 мкм) на ультрамікроскопі 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.

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

Інфрачервона термографія. Вимірювання і збереження в цифровому форматі значень температури атмосферного повітря, ґрунту і листків на різних етапах розвитку здійснювали із застосуванням переносного пристрою "Fluke Ti105" (Fluke Corp, США).

Інфрачервону камеру пристрою розміщували на відстані 30-50 см від поверхні ґрунту над досліджуваними рослинами. На оцифрованих растрових і інфрачервоних зображеннях виділяли по тридцять пікселів в межах листової поверхні і ґрунту.

Цифрові температурні значення кожного пікселя інфрачервоного зображення зберігались автоматично на MicroSD пам'яті і в подальшому у ручному режимі експортувались в програмне середовище Statistica 11.0 для статистичного аналізу та графічної візуалізації результатів експериментів.

Для синхронного автоматичного вимірювання і збереження у вказаний інтервал часу на MicroSD цифрових значень температури листків, атмосферного повітря і ґрунту, вологості ґрунту застосовували мультиметричний пристрій "DMLAS-1" (Федюк, 2017). Отримані приладами дані опрацьовувались з використанням методів математичного аналізу варіаційної статистики.

Полярографія. Інтенсивність поглинання листками кисню визначали із застосуванням полярографа, оснащеного електродом конструкції Кларка (Федюк, 2016). Нарізані фрагменти листових 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).

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 із застосуванням мультиметра UT-60E (Unitrend International Ltd., Тайвань), з'єданого з комп'ютером (Топчий, Ситник 2005; Поліщук, 2017). Досліджувані листки попередньо витримували в темряві протягом 20 хв. Після цього вмикали вимірювальне світло (*ML*, Measuring Light) (Корнеев, 2002) з частотою 2 кГц і щільністю 0,2 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 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 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 мкмоль фотонів $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) тривалістю 1 с і вимірювали максимальний рівень флуоресценції F'_m у адаптованих до світла листків. Через 20 с вимикали актинічне світло й визначали мінімальний рівень флуоресценції F'_m у адаптованих до світла листків. На основі виміряних показників флуоресценції хлорофілу *a* обчислювали потенційний квантовий вихід фотохімії комплексів ФСII у адаптованому до темряви стані F_v / F_m та потенційний квантовий вихід в адаптованому до світла стані F'_v / F'_m за Максвеллом (Maxwell, 2000), фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP), та нефотохімічне гасіння флуоресценції (qN) за Шрейбер та ін. (Schreiber et al., 1986), реальний квантовий вихід електронного транспорту (Φ_{PSII}) за Дженті та ін. (Genty et al., 1989). Швидкість перенесення електронів ЕТр (ETR) визначали на основі ефективного квантового виходу ФСII (Φ_{PSII}), щільності потоку фотонів ЦПФ (PFD) і коефіцієнту поглинання КП (AC) за формулою: $ETR = \Phi_{PSII} \cdot PFD \cdot 0,5 \cdot AC$ (Корнеев, 2002),

припускаючи, що рівномірний розподіл фотосинтетичного активного випромінювання між ФСІ і ФСП відображається коефіцієнтом поглинання 0,84 (Björkman, Demmig, 1987). Щільність потоку фотонів над листками вимірювали пристроєм “LI-250 Light Meter” (Li-Cor Inc., США), оснащеним сферичним квантовим сенсором.

Статистична обробка кількісних даних. Виміряні під час експериментів абсолютні значення показників опрацьовували із застосуванням комп’ютерної програми “Statistica 11.0. Середні значення, 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 визначали за t-критерієм Стьюдента. Різницю значень показників вважали достовірною при $p \leq 0,05$. Силу і напрям можливого зв’язку між факторними і результативними середніми значеннями параметрів обчислювали за коефіцієнтом кореляційного зв’язку (r). Зв’язок вважали відсутнім, якщо коефіцієнт кореляції $r \leq 0,15$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологія, анатомія та мікроструктура поверхні листків *G. nivalis* на різних етапах розвитку. Поява листків ефемероїда припадала на лютий, коли температура повітря досягала $-6,8$ °С. Через 14-18 діб після появи листків над поверхнею ґрунту, починалось квітнення рослин при температурі $+4,9$ °С. Наприкінці травня на п’ятому році розвитку, після дозрівання плоду, листки ефемероїда поступово жовтіли і відмирили разом з цибулинами.

На кожному етапі розвитку рослин, починаючи з появи листків і до квітнення, довжина листків суттєво збільшувалась, тоді як ширина, навпаки, змінювалась незначно (рис. 1А). Таке інтенсивне видовження листків, очевидно, зумовлено необхідністю швидкого розвитку за короткотривалий весняний період.

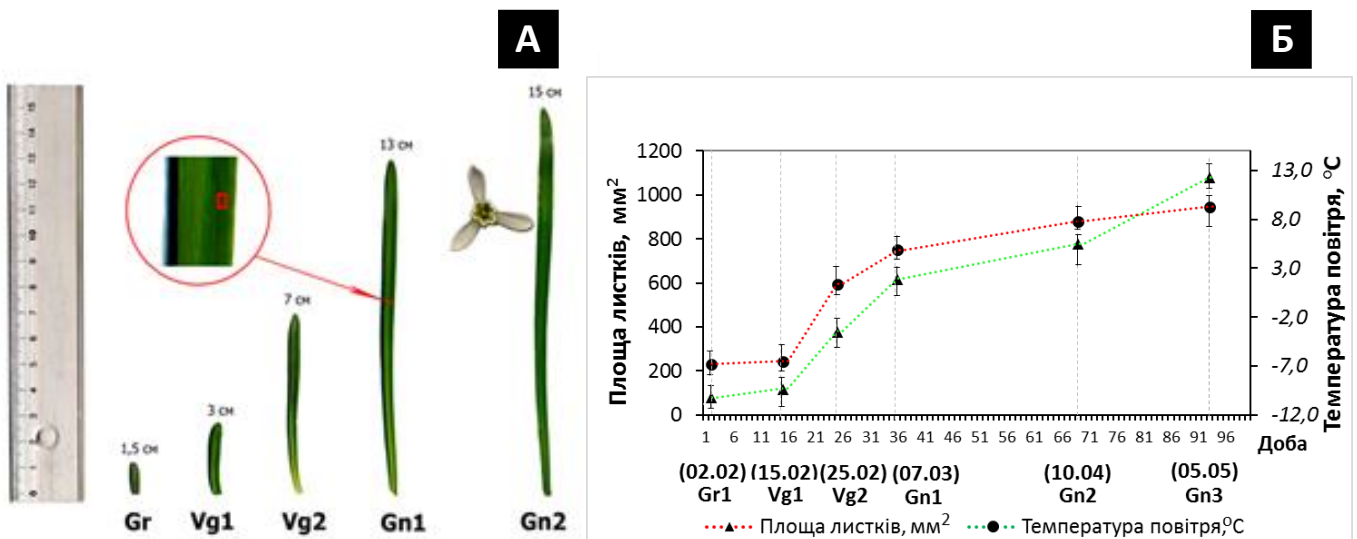


Рис.1. Динаміка росту листків *G. nivalis* (А), змін їх площі та показників температури атмосферного повітря (при $p \leq 0,05$) (Б) у природних умовах: поява листків на поверхні ґрунту (Gr), рання (Vg1) і пізня (Vg2) стадія вегетативного етапу, рання (Gn1) і пізня (Gn2) стадія генеративного етапу; стрілкою позначено ділянку, з якої брали матеріал для мікро- і ультраструктурних досліджень.

Площа листків протягом весняних етапів розвитку *G. nivalis* змінювалась нерівномірно, однак ріст листків ефемероїда корелював зі змінами температури атмосферного повітря, особливо в період максимального їх збільшення перед бутонізацією (рис. 1 Б).

Спостереження на напівтонких зрізах листків показали, що анатомічна структура листків належить до ізолатерального типу, та є типовою для багатьох інших однодольних рослин. Епідермальні клітини вкриті товстим шаром кутикули. В епідермі чітко виділяються замикаючі клітини продохів, занурені на третину нижче сусідніх епідермальних клітин (рис. 2 А, вставка).

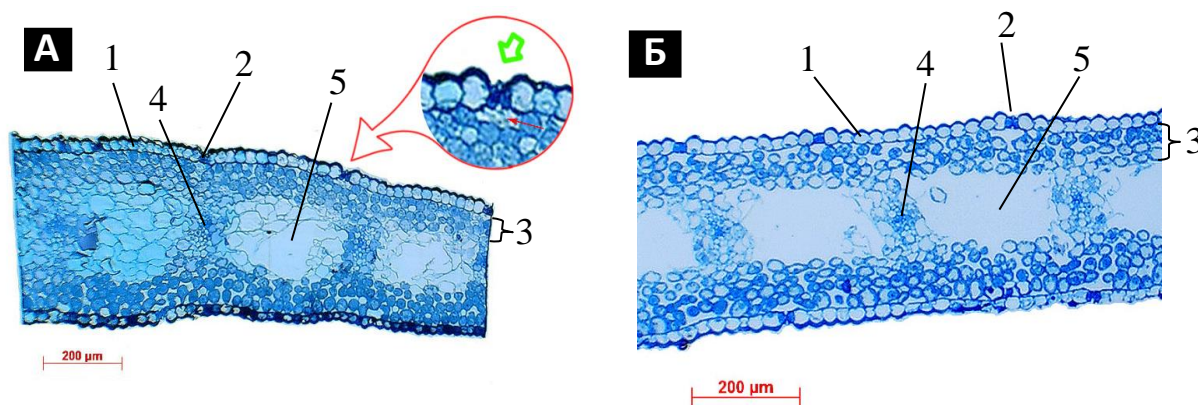


Рис. 2. Поперечні зрізи листових пластинок *G. nivalis* на вегетативному (А) і генеративному (Б) етапах весняного росту рослин: 1 – епідерма, 2 – продих, 3 – паренхіма, 4 – судинний пучок, 5 – порожнина (світлова мікроскопія).

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. Особливістю структури листків є великі центральні порожнини, які на вегетативному етапі розвитку рослин містять залишки клітинних стінок мертвих клітин (див. рис. 2 А). 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. 2 Б).

Епідермальні клітини *G. nivalis* мають дещо опуклу форму і тому частково виступають відносно базового рівня поверхні, утворюючи горбисті підвищення (рис. 3 А, Б). Поблизу продихів (див. рис. 3 А, Б) висота виступаючої частини епідермальних клітин становила в середньому $15,19 \pm 0,38$ мкм (при $p \leq 0,05$), тобто була на 79,6 % більше порівняно з горбистими ділянками, віддаленими від продихів. Припускаємо, що наявність горбистих виступаючих частин епідермальних клітин поблизу продихів сприяє їх захисту від механічного пошкодження. Епідермальні клітини листків на всіх етапах весняного розвитку вкриті кутикулою та епікутикулярним воском. 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 В).

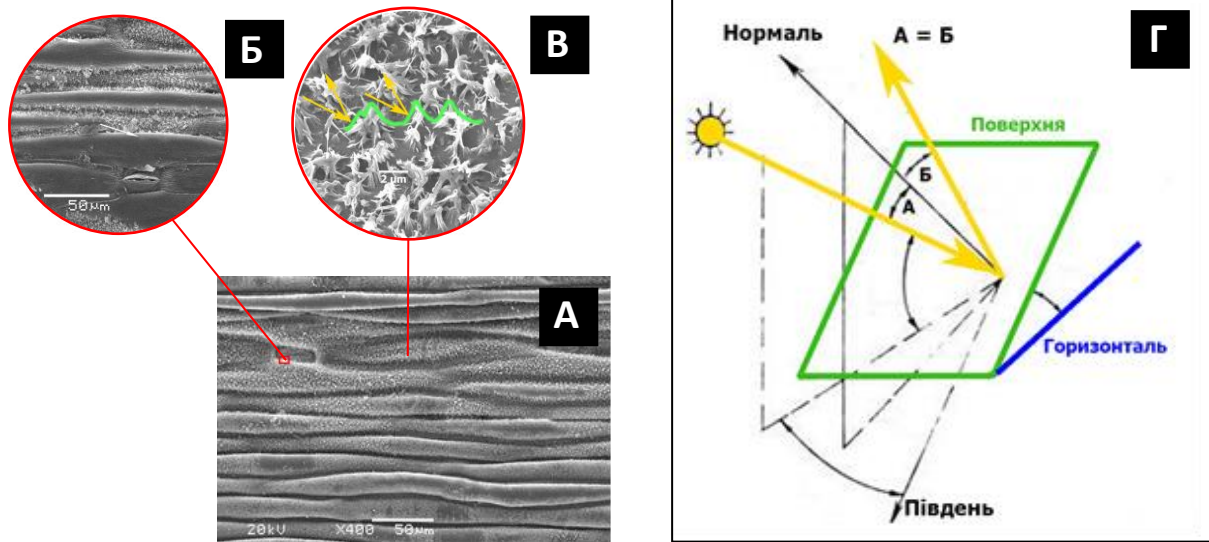


Рис. 3. Фрагмент абаксіальної поверхні листка *G. nivalis* на етапі квітнення: загальний вигляд (А), горбисті підвищення епідермальних клітин (позначені стрілками) поблизу продихів (Б), воскові кристалоїди (В) та схема розсіювання променів світла (Міхеєнко, 2018) восковими кристалоїдами (Г) (сканувальна електронна мікроскопія, масштаб А, Б – 50 μm, В – 2 μm).

Такі особливості структури кристалоїдів на адаксіальній поверхні зумовлюють формування покриву з розсіюючими властивостями (рис. 3 Г), що сприяє захисту від надмірного потоку фотонів. Продихи листків у *G. nivalis* належать до аперігенного типу. Вони розташовані майже рівномірно на обох поверхнях листових пластинок (амфістоматично) і орієнтовані паралельно довгій осі листків (рис. 3).

Замикаючі клітини продихів оточені чітко вираженим кутикулярним валиком і дещо занурені в епідерму, а їх центральна частина з продиховою щілиною незначно виступає над ними. Морфометричний аналіз продихів *G. nivalis* показав, що частка продихів з різним ступенем відкриття від загальної кількості продихів на абаксіальній стороні молодих листків складала близько 20%, тоді як на стадії квітнення цей показник збільшувався до 30% і на адаксіальній поверхні він досягав 59%. Вважаємо, що структурна організація поверхні листків і продихів є важливою складовою загальної стратегії регулювання газообміну ефемероїда за низьких температур.

Структурно-функціональні особливості мітохондрій мезофілу листків *G. nivalis* за низьких температур. Для дослідження особливостей структури мітохондрій з використанням методів електронної мікроскопії, відбирались клітини другого шару мезофілу на адаксіальній стороні листків рослин *G. nivalis* (див. рис. 2). Вплив температури атмосферного повітря проявлявся у зміні форми, розмірів площі мітохондрій та крист (рис. 4). На початку розвитку листків за температури повітря $-3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ інтактні мітохондрії були переважно округлої форми зі слабо розвинутими кристами (рис. 4 В), що вказує на їх здатність витримувати мінусові температури при підготовці до подальшого інтенсивного продукування АТФ. За температури повітря $+4,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, прослідковувалось збільшення площі крист на зрізах (рис. 4 Е) та довгої осі мітохондрій (на 37%), порівняно з початковим етапом появи листків.

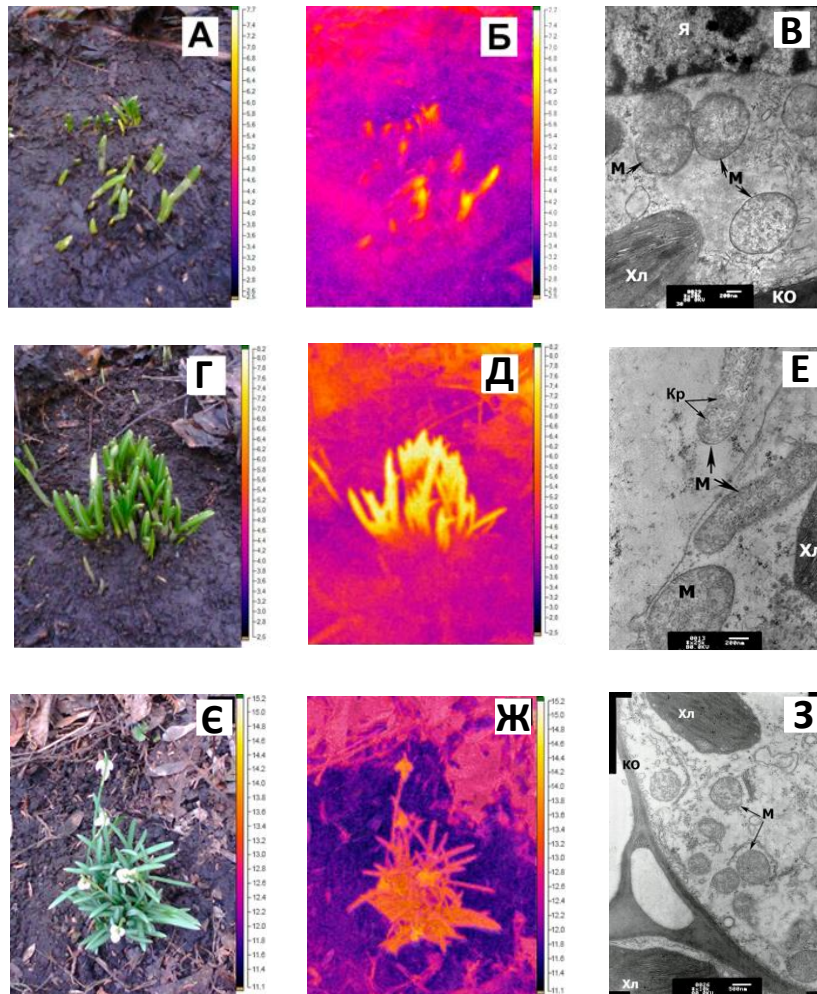


Рис. 4. Фотографічне (А, Г, Є) і термографічне (Б, Д, Ж) зображення листків та електронно-мікроскопічне (В, Е, З) зображення мітохондрій клітин мезофілу на етапах: появи листків з ґрунту (А, Б, В) початку бутонізації (Г, Д, Е) та квітнення (Є, Ж, З) рослин *G. nivalis* в природних умовах (інфрачервона термографія та трансмісійна електронна мікроскопія, масштаб В – 200 nm, Е – 200 nm, З – 500 nm).

При появі листків за температури поверхні ґрунту $-5,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ мітохондрії на зрізі клітин були переважно округлої форми (див. рис. 4 В). Нечисленні кристи вказували на те, що мітохондрії перебували в неактивному функціональному стані. На вегетативному етапі та бутонізації температура листків була в 1,7 раза вищою порівняно з температурою ґрунту (рис. 4 Г, Д). На етапі квітнення при температурі повітря $+8,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ та температурі ґрунту $+11,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, температура листків була нижчою, ніж квіток (рис. 4 Є, Ж), при цьому мітохондрії були більш округлі (рис. 4 З) порівняно з етапом бутонізації (див. рис. 4 Е).

Залежність інтенсивності дихання від вологості повітря підтверджена коефіцієнтом високої прямої кореляції ($r = +0,80$). На фоні зростання значень температури повітря (рис. 5 В) і загального дихання (рис. 5 Б), помітна тенденція до зниження з часом частки ціанід-резистентного дихання (рис. 5 Г). Його інтенсивність варіювала і збільшувалась 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*.

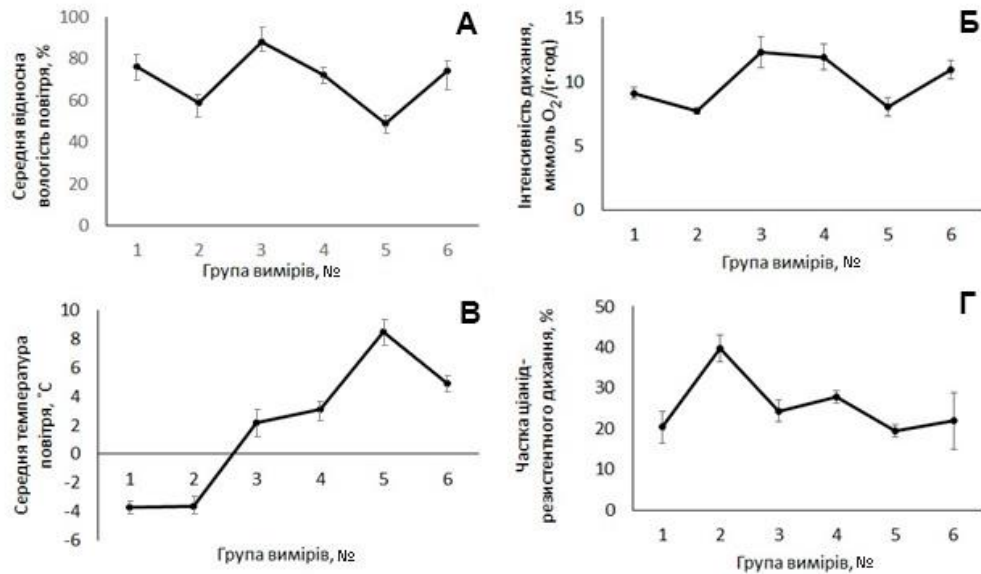


Рис. 5. Зміни вологості (А), інтенсивності дихання (Б), температури повітря (В) та частки ціанід-резистентного дихання (Г) протягом весняного розвитку *G. nivalis* у групах вимірів: 1 – поява листків з ґрунту, 2, 3 – рання і пізня стадії вегетативного етапу, 4, 5 – бутонізація, 6 – квітнення.

Структурно-функціональні зміни хлоропластів на різних етапах розвитку. Після появи листків відбувалось формування тилакоїдної системи хлоропластів, подібно іншим ефемероїдам (рис. 6 А, Г).

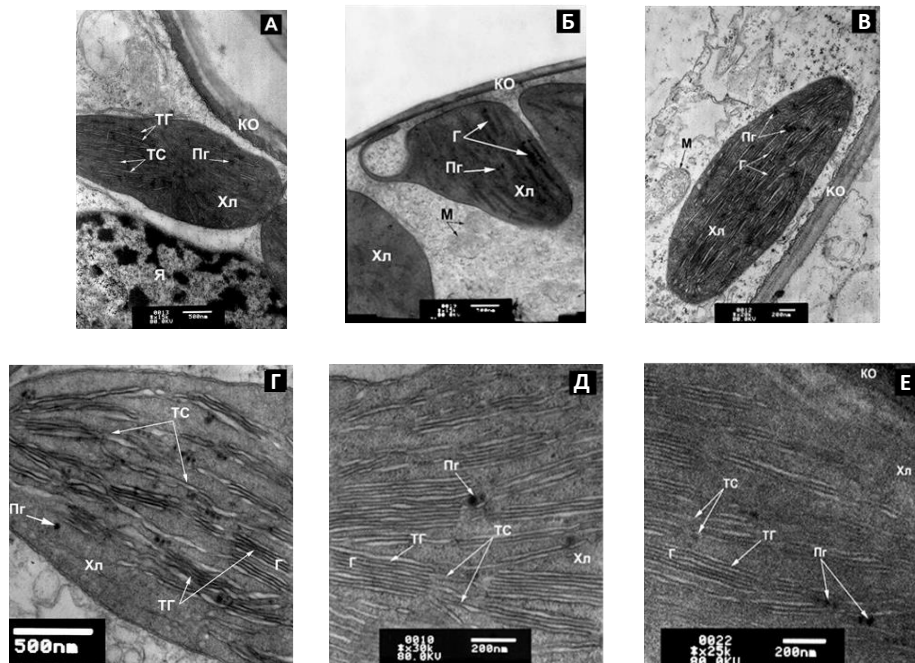


Рис. 6. Хлоропласти (А, Б, В) та їх фрагменти (Г, Д, Е) з клітин мезофілу листків *G. nivalis* на етапах появи листків на поверхні ґрунту (А, Г), вегетативному (Б, Д) та генеративному (В, Е) в природних умовах: клітинна оболонка (КО), мітохондрія (М), хлоропласт (Хл), грана (Г), пластоглобула (Пг), тилакоїд грани (ТГ) та строми (ТС) (трансмійна електронна мікроскопія, масштаб А, Б, Г – 500 nm, В, Д, Е – 200 nm).

Виявлені невисокі грани, локальні набрякання тилакоїдів гран і тилакоїдів строми, відсутність крохмальних зерен, наявність незначної кількості пластоглобул вказують, що хлоропласти зазнали впливу несприятливих умов, але залишились здатними до функціонування. На вегетативному етапі розвитку *G. nivalis* особливою ознакою хлоропластів мезофілу листків була їх амебоїдна форма (рис. 6 Б, Д), яка розглядається як ознака пристосування метаболізму пластид до впливу стресових умов (Wise, 2006). На генеративному етапі розвитку *G. nivalis* хлоропласти листків були переважно еліпсоїдної форми з невисокими гранами.

Площа гран збільшувалась вдвічі до максимального значення $7,5 \cdot 10^{-1}$ мкм² на початковій стадії етапу появи листків з ґрунту (Gr1) і до пізньої стадії вегетативного етапу розвитку (Vg2), за температури атмосферного повітря від $-6,8$ °С до $+1,4$ °С. 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 $3,8 \cdot 10^{-1}$ мкм² (рис. 7 Б).

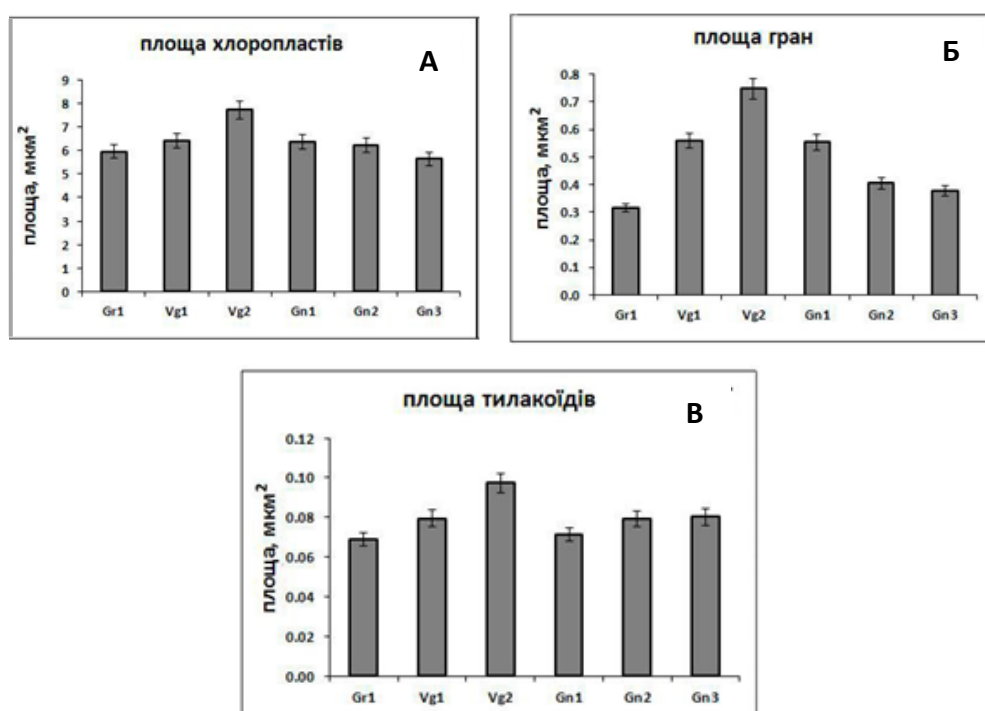


Рис. 7. Зміни розмірів площ хлоропластів (А), гран (Б) і тилакоїдів гран (В) в листках *G. nivalis* під час появи листків з ґрунту (Gr), на вегетативному (Vg) і генеративному (Gn) етапах весняного розвитку в природних умовах.

Площа тилакоїдів гран на етапі появи листків з ґрунту була мінімальною і не перевищувала в середньому $6,9 \cdot 10^{-2}$ мкм². На вегетативному етапі розвитку площа тилакоїдів гран збільшувалась у 1,2 рази, порівняно з попереднім періодом появи листків з ґрунту (рис. 7 В). При цьому, на пізньому вегетативному етапі (Vg2) грани й тилакоїди строми щільно заповнювали хлоропласти (див. рис. 6 Д). 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.

Виявлені ультраструктурні зміни хлоропластів в листках *G. nivalis*, ймовірно, пов'язані з фотохімічною активністю хлоропластів і спрямовані на запобігання руйнування ФСП за низьких температур. Згідно з даними таблиці 1, фотохімічні показники листків *G. nivalis* на вегетативному й генеративному етапах розвитку дещо відрізнялися.

Таблиця 1

Параметри індукції флуоресценції хлорофілу листків *G. nivalis*

Етапи*	ЩПФ, $\mu\text{кмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	F_v/F_m	qP	qN	Φ_{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

* Gr – поява листків на поверхні 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; Φ_{PSII} – ефективний квантовий вихід фотохімічного перетворення енергії ($M \pm \sigma$).

При активації листків світлом з ЩПФ $350 \mu\text{кмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ 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 ($700 \mu\text{кмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) на генеративному етапі розвитку qP знижувався вже на 20,2% порівняно з вегетативним етапом. Коефіцієнт нефотохімічного гасіння qN при інтенсивності освітлення $350 \mu\text{кмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ у листків на генеративному етапі розвитку перевищував величину qN на вегетативному етапі на 10,6%, тоді як при $700 \mu\text{кмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – на 15,4%, що вказує на активну трансформацію фотосинтетичного апарату в ході онтогенезу.

Структурно-функціональні зміни хлоропластів, що зазнали впливу екзогенної сахарози за низьких температур. В умовах експериментального вирощування *G. nivalis* при середній температурі повітря $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ і появі листків над поверхнею ґрунту в хлоропластах листків не проявлялись значні пошкодження ультраструктури тилакоїдів гран (рис. 8).

Після поступового охолодження листків до температури $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ у хлоропластах контрольних рослин виявлявся різкий набряк гран, а у листків, оброблених розчином сахарози (Сах), набряки були значно меншими (рис. 8 Г, Е). Обробка Сах призвела до збільшення кількості тилакоїдів на грану при $0,02 \text{ M Сах}$ та $0,1 \text{ M Сах}$ на 17 і 119%), тоді як довжина тилакоїдів гран зменшилась на 33 і 22%, а товщина тилакоїдів на 3 і

22%. Зі зниженням температури до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ деструкція хлоропластів контрольних листків не проявлялась, але спостерігалась фрагментація і набряк гран (рис. 8 Є). У хлоропластах, оброблених розчином $0,1\text{ M Сах}$, помітні позитивні зміни (рис. 8 З) порівняно з відповідним контролем без Сах (див. рис. 8 Є).

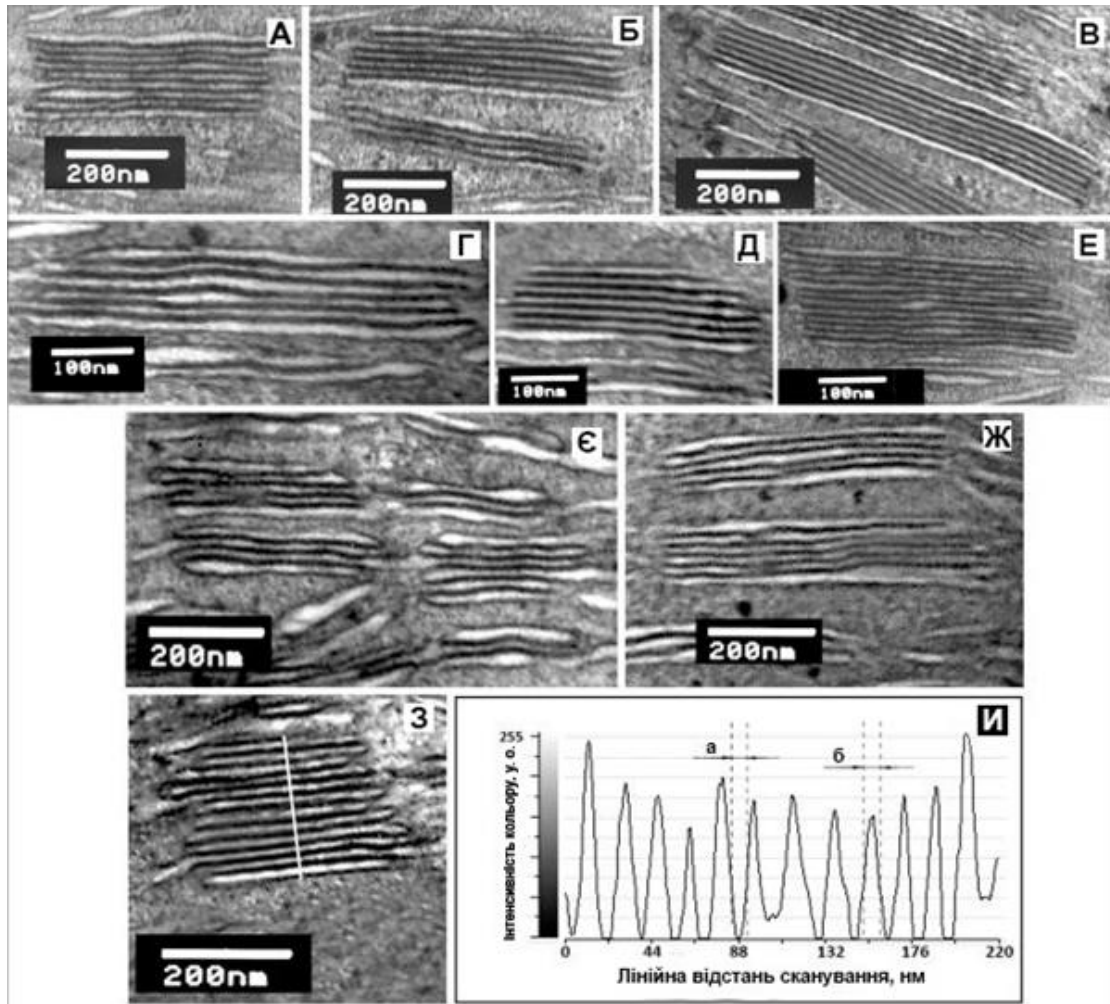


Рис. 8. Ультраструктура тилакоїдів гран в хлоропластах листків *G. nivalis*: А – без сахарози (Сах), (Б–В) після 1 год. експозиції при $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, Б – з $0,02\text{ M Сах}$, В – з $0,1\text{ M Сах}$; (Г–Е) після 1-год. експозиції при $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, Г – без Сах, Д – з $0,02\text{ M Сах}$, Е – з $0,1\text{ M Сах}$; (Є) після 1-год. експозиції при $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, Є – без сахарози, Ж – з $0,02\text{ M Сах}$, З – з $0,1\text{ M Сах}$; И – гістограма профілю лінійного сканування інтенсивності кольору пікселів, де а – товщина тилакоїда; б – ширина люмену (трансмісійна електронна мікроскопія, масштаб А, Б, В, Є, Ж, З – 200 nm , Г, Д, Е – 100 nm).

Порівняно з даними, отриманими за температури $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, після обробки $0,02\text{ M Сах}$ за температури $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ кількість тилакоїдів в грані була меншою на 10%, проте з $0,1\text{ M Сах}$ вона збільшувалась на 88%. При такому ж порівнянні товщина тилакоїда була більшою як з $0,02\text{ M Сах}$, так і з $0,1\text{ M Сах}$, відповідно на 18% та 10%. Площа зрізу грани при $0,02\text{ M Сах}$ була вище на 31% внаслідок збільшення кількості тилакоїдів (на 16%), а також їх товщини (на 18%); при обробці $0,1\text{ M Сах}$ площа зменшилась на 26% переважно внаслідок зменшення довжини та ширини тилакоїдів.

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.

Припускали, що зміни ультраструктури гран в хлоропластах можуть бути пов'язані зі змінами фотохімічної активності фотосинтетичного апарату листків. 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 °С (рис. 9 А).

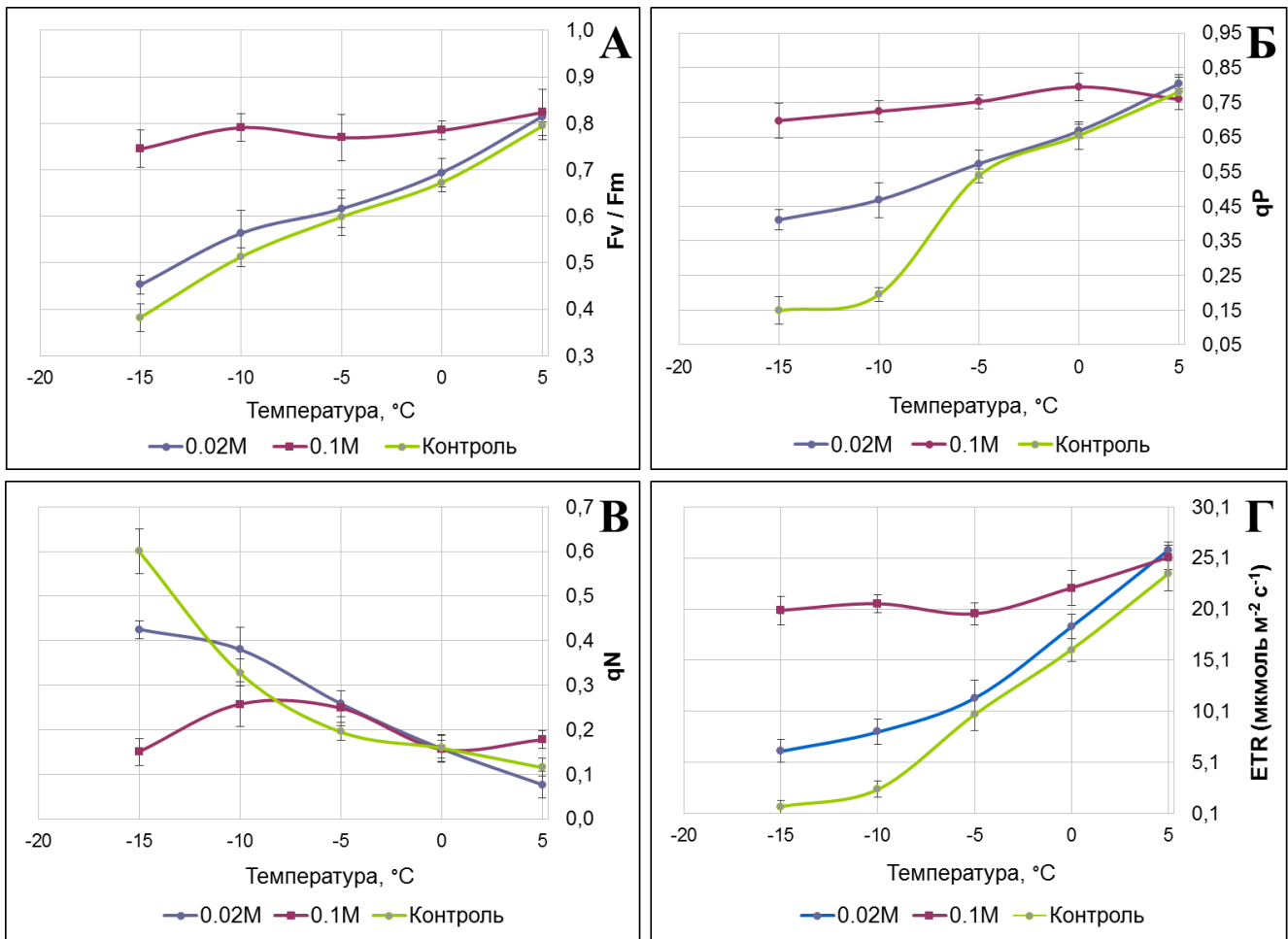


Рис. 9. Залежність показників флуоресценції хлорофілу листків *G. nivalis* від температури та обробки розчинами 0,02 і 0,1 М Сах: (А) потенціал максимального квантового виходу фотохімії ФСII (F_v / F_m) у листків, пристосованих до темряви; (Б) фотохімічне гасіння (qP); (В) нефотохімічне гасіння (qN); (Г) швидкість транспортування електронів (ETR). Достовірність різниці з контролем при $p \leq 0,05$.

У контрольних листках *G. nivalis* температурні межі від +5 до -5 °С є оптимальними для функціонування ФСА, що відображено коефіцієнтами $qP=0,53$ (рис. 9 Б) і $qN=0,19$ (рис. 9 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 Сах (0,1 М). Зокрема, їх оптимальні температурні межі змінювались 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 (рис. 9 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.

За цих же умов в листках, 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. Отримані дані вказують на те, що у *G. nivalis* за низьких температур сахароза бере участь у фотохімічних та структурних змінах фотосинтетичного апарату, які спрямовані на забезпечення ефективності його функціонування.

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 листків 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 відкриття (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 РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Федюк ОМ**, Білявська НО (2015) Ультроструктурні 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) Ультроструктурні 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 самостійно 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 саліцилгидроксамової 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. Modering methodologies, 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.

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. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2019.

В дисертаційній роботі представлено результати досліджень ультраструктурних і функціональних змін хлоропластів та мітохондрій, мікроструктури поверхні і продихів листків *G. nivalis* за дії низьких температур, а також різних концентрацій екзогенної сахарози. Показано, що в природних умовах за низьких температур на вегетативному етапі розвитку ефемероїда структурні зміни тилакоїдів і гран призводили до збільшення їх площі, що сприяло забезпеченню високого рівня ефективного квантового виходу перетворення енергії і запобігало руйнуванню фотосистеми II. В лабораторних умовах отримано підтвердження, що в стабілізації структури гранальної системи бере участь сахароза. За мінусових температур (від -5 до -15 °C) в присутності екзогенної 0,1 М сахарози у хлоропластів зберігалась інтактність гран, збільшувались їхня площа і кількість тилакоїдів. Це запобігало пошкодженню структури фотосинтетичного апарату і забезпечувало його функціонування за вказаних температур. Перебудови мітохондрій призводили до збільшення їхньої площі та крист, що корелювало з максимальними значеннями інтенсивності ціанід-резистентного дихання на вегетативному етапі розвитку ефемероїда, запобігало руйнуванню мітохондрій та сприяло забезпеченню клітинного дихання за низьких температур. Встановлено, що зміни співвідношення закритих і відкритих продихів на адаксіальній та абаксіальній поверхнях листків сприяють успішній реалізації загальної стратегії виживання у весняний період. Виявлені на кутикулі листків численні кристалоїди воску формують нерівну поверхню, яка здатна розсіювати надмірний потік фотонів, що запобігає перегріву листків і сприяє збереженню фотосинтетичного апарату від руйнування. Викладені в роботі результати дослідження розширюють уявлення про роль структурно-функціональних змін у формуванні стійкості дихання і фотосинтезу *G. nivalis* до низьких температур.

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

АННОТАЦИЯ

Федюк О.М. Структурно-функциональные особенности хлоропластов и митохондрий листьев *Galanthus nivalis* L. при низких температурах. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2019.

В диссертационной работе представлены результаты исследования структурных и функциональных изменений хлоропластов и митохондрий, микроструктуры поверхности и устьиц *G. nivalis* при низких температурах. Показано, что в природных условиях при низких температурах на вегетативном этапе развития эфемероидов, структурные изменения тилакоидов и гран приводили к увеличению их площади, что способствовало обеспечению высокого уровня эффективного квантового выхода преобразования энергии и предотвращало разрушение фотосистемы II. В лабораторных условиях получено подтверждение, что в стабилизации структуры гранальной системы участвует сахароза. При минусовых температурах (от -5 до -15 °C) в присутствии экзогенной 0,1 М сахарозы у хлоропластов сохранялась интактность гран, увеличивались их площадь и количество тилакоидов. Это предотвращало повреждение структуры фотосинтетического аппарата и обеспечивало его функционирование при указанных температурах. Перестройки митохондрий приводили к увеличению их площади и крист, что коррелировало с максимальными значениями интенсивности цианид-резистентного дыхания на вегетативном этапе развития эфемероида, предотвращало разрушение митохондрий и способствовало обеспечению клеточного дыхания при низких температурах. Установлено, что изменения соотношения закрытых и открытых устьиц на адаксиальной и абаксиальной поверхностях листьев способствуют успешной реализации общей стратегии выживания в весенний период. Обнаруженные на кутикуле листьев многочисленные кристаллоиды воска формируют неровную поверхность, которая способна рассеивать избыточный поток фотонов, что предотвращает от перегрева листа и сохраняет от разрушения фотосинтетический аппарат. Изложенные в работе результаты исследования расширяют представления о роли структурно-функциональных изменений в формировании устойчивости дыхания и фотосинтеза *G. nivalis* к низким температурам.

Ключевые слова: *Galanthus nivalis* L., листья, ультраструктура, митохондрия, кристы, альтернативная оксидаза, хлоропласт, тилакоиды, грана, устьица, низкая температура, экзогенная сахароза.

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, speciality 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – 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, 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. Observations for semi-thin sections of leaves showed that the anatomical mesophyll structure of leaves is of the isolateral type, as some representatives of amaryllis and is typical for many other monocotyledonous plants. Epidermal cells are covered with a thick layer of cuticle.

The mesophyll cells' profiles on the section are round or oval in shape. The peculiarity of the leaves structure is the presence of large central cavities filled with mucous substance, between which vascular bundles stand out surrounded by bundle sheath cells.

It was shown that at the appearance of leaves, local swelling of granal and stromal thylakoids occurred in chloroplasts at low temperatures under natural conditions. The presence of low grana, an insignificant amount of plastoglobules and the absence of starch grains indicated that chloroplasts were exposed to adverse conditions, but remained capable of functioning. At the vegetative stage, a special feature of mesophyll chloroplasts was their amoeboid form, which is obviously related to the response to a low temperature. The photochemical parameters of the *G. nivalis* leaves at the vegetative and generative stages of development were somewhat different. In particular, at the generative stage, with a higher illumination level ($700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) qP was already reduced by 20.2% compared with the vegetative stage. At the generative stage, the non-photochemical quenching coefficient, qN, exceeded the value of qN at the vegetative stage by 10.6% at $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, while at $700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ – by 15,4%. This indicates an active transformation of the photosynthetic apparatus during *G. nivalis* ontogenesis.

In the laboratory conditions, it was received confirmation that sucrose is involved in stabilizing the granal structure of the leaves. At subzero temperatures (from -5 to -15 °C), the grana in chloroplasts remained intact, its area and the number of thylakoids increased in the presence of 0,1 M exogenous sucrose. This prevented damage of the photosynthetic apparatus structure and ensured its functioning at the indicated temperatures. The mitochondria became able to be resistant to low temperatures under natural conditions. Reconstruction in the mitochondria led to an increase in its area and cristae area that correlated with the maximum intensity of cyanide-resistant respiration at the vegetative stage of ephemeroïd development, prevented the mitochondria destruction, and contributed to the provision of cellular respiration at low temperatures. It was established that changes in the ratio of closed and open stomata on the adaxial and abaxial surfaces of the leaves contribute to the success of the general strategy for survival of ephemeroïds at different spring temperatures and illumination. The numerous wax crystalloids found on the leaves cuticle form an uneven surface that is able to disperse the excess of photon flux, which helps prevent overheating of the leaves and preserve the photosynthetic apparatus from destruction. The results presented in the study expand the understanding a role of the structural-functional changes in the formation of respiratory and photosynthetic stability to low temperatures in *G. nivalis*.

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