

А. М. СИЛАЕВА, Д. А. МОШКОВ, М. С. ГАМАЮНОВА,
Л. К. ОСТРОВСКАЯ

СТРУКТУРА ГРАННЫХ И МЕЖГРАННЫХ ТИЛАКОИДОВ ХЛОРОПЛАСТОВ КУКУРУЗЫ ПО ДАННЫМ МЕТОДА КРИОСКАЛЫВАНИЯ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 10 VI 1975)

Низкотемпературная фиксация биологических объектов обладает тем преимуществом перед химической фиксацией, что обеспечивает практически мгновенную остановку жизненных процессов, сохраняя прижизненную локализацию органических и неорганических компонентов клетки и не изменяя их химических свойств (^{1, 2}). Хотя методу криоскалывания присущ ряд существенных недостатков (^{3, 4}), информация о строении биомембран, получаемая с его помощью является наиболее полной по сравнению с другими методами препарирования.

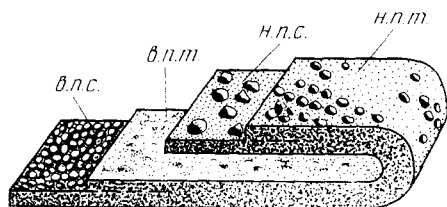


Рис. 1. Поверхности фотосинтетических мембран, обнаруживаемые при криоскалывании. Обозначения в тексте

Применяя криоскалывание к исследованию фотосинтетических мембран, можно показать, что косой (ступенчатый) скол через тилакоид последовательно обнажает четыре различных поверхности (рис. 1): 1) наружную поверхность тилакоида (н.п.т.), 2) паружную (выпуклую) поверхность скола (н.п.с.), 3) внутреннюю поверхность тилакоида (в.п.т.) и 4) внутреннюю (вогнутую)

поверхность скола (в.п.с.). В работах (⁵⁻⁷) этим поверхностям присвоены буквенные обозначения — соответственно А, В, D и С. Впоследствии введены (⁸) дополнительные индексы для поверхностей скола В и С в случае свободного тилакоида (B_u, C_u) и тилакоида, находящегося в контакте с другим тилакоидом (B_s, C_s). Э. Гверин-Дюмартрэ и др. (⁹) выделяют только три поверхности, опуская в.п.т. и обозначая остальные Y', X и Y . К. Мюлеталер (¹⁰) предпочитает давать поверхностям словесные обозначения, но неудачно именует выпуклую поверхность скола внутренней, а вогнутую — наружной. Этот же терминологический нонсенс сохраняется и у других авторов (¹¹).

Как показала практика исследований, при тангенциальном направлении скола чаще всего обнажаются поверхности н.п.с. и в.п.с., реже н.п.т. и совсем редко в.п.т. (т. е. плоскость разлома редко проходит через полость тилакоида, гораздо чаще происходит расщепление мембран). Наиболее изучены поверхностные н.п.с. и в.п.с. Многочисленными исследованиями (^{5-10, 12}) показано, что первая усыяна крупными (16—17,5 нм) редко расположенными частицами, тогда как для второй характерна плотная упаковка более мелких частиц (11—12 нм). Большинство авторов определяло лишь средний размер частиц. Статистическая обработка выявила значительную дисперсию размеров частиц и многовершинность спектров распределения (^{8, 14}). В ряде работ (^{6, 8, 10}) высказываются предположения, что частицы поверхности н.п.с. связаны с функционированием фотосистемы II, а час-

тицы поверхности в.п.с. — с фотосистемой I. До недавнего времени не удавалось получить четкой структурной характеристики поверхностей н.п.т. и в.п.т. Некоторые авторы ⁽⁵⁾ считали поверхность н.п.т. гладкой или проявляющей слабую рельефность за счет выпирания крупных частиц из нижележащего слоя п.п.с. В работах ^(11, 13) было обнаружено, что поверхность н.п.т. покрыта частицами размером 14—15 нм. Параллельное использование методов негативного контрастирования ⁽¹¹⁾ и иммунохимии ⁽¹³⁾ позволило заключить, что эти частицы являются частицами сопрягающего фактора хлоропластов.

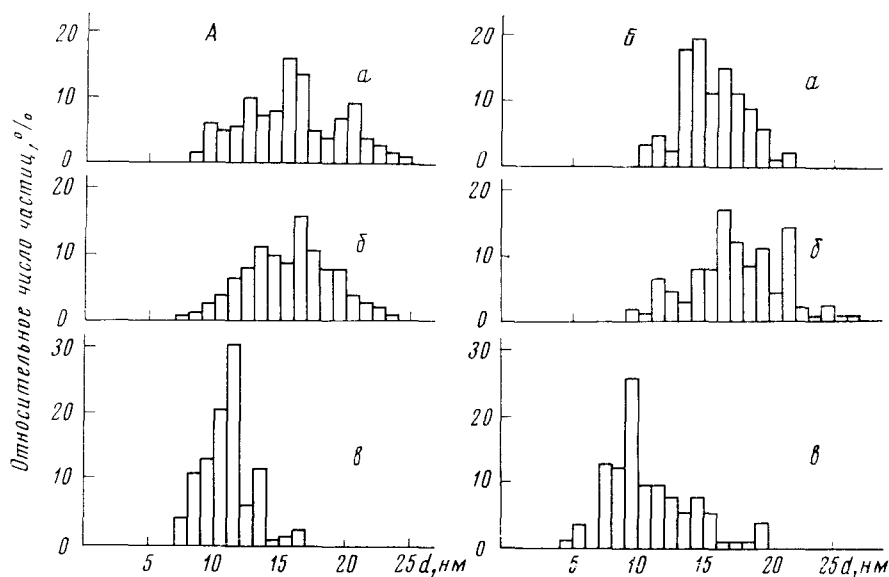


Рис. 2. Распределения по размерам частиц различных поверхностей тилакоидов гран (А) и межгранных тилакоидов (Б). Объяснения значений а, б, в см. в тексте

В задачу настоящего исследования входило изучение структурных особенностей двух типов фотосинтетических мембран: тилакоидов гран и межгранных тилакоидов, функциональная разнокачественность которых была продемонстрирована ранее ^(6, 14).

Из листьев четырехнедельных растений кукурузы выделяли хлоропласты мезофилла по методике, описанной ранее ⁽¹⁵⁾. Осадок хлоропластов ресуспендировали в 20%-ном глицерине и подвергали замораживанию и скалыванию на установке криоскалывания, созданной в Институте биологической физики АН СССР. Авторы благодарят В. Л. Боровягина за предоставленную возможность провести эту часть исследования. Полученные реплики исследовали в электронных микроскопах ЭМВ-100Л и JEM-100В. Измерения на микрофотографиях, выполненных при увеличении 30 000, 60 000 и 120 000 $\times$, проводили на измерительном микроскопе МИР-12. Диаметры частиц измерялись в направлении, перпендикулярном к направлению напыления. Учет влияния толщины напыления не производился. Результаты измерений приведены в виде гистограмм на рис. 2.

Исследования показали, что наружная поверхность тилакоидов гран (н.п.т.г.) покрыта крупными полидисперсными (рис. 2А, а) частицами, расположенными в виде паракристаллической решетки с ячейкой $33,9 \pm 1,9 \times 23,4 \pm 2,4$ нм. Многовершинность спектра размеров частиц, по-видимому, является отражением их разнокачественности. Все эти частицы не очень прочно связаны с поверхностью, часть из них при препарировании и скалывании слущивается, образуя «пропелшины». Поэтому средняя плотность

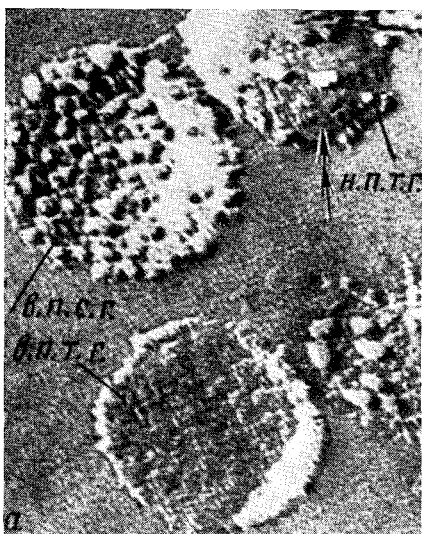
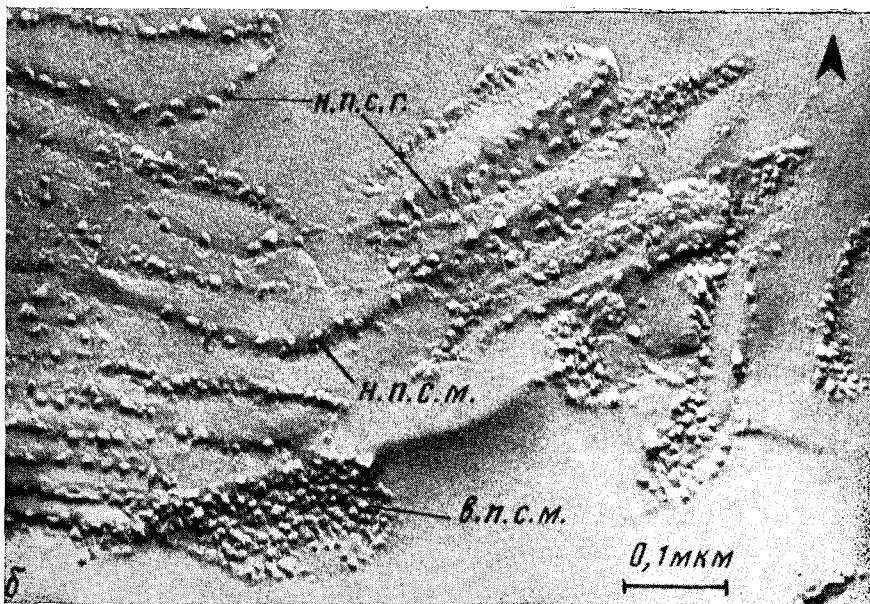


Рис. 3. Электронно-микроскопические фотографии гранных и межгранных тилакоидов хлоропластов кукурузы при использовании метода криоскальвания. Объяснения значений *а*, *б* и сокращений см. в тексте. Стрелками в углу каждого снимка указано направление папыления



упаковки их колеблется в широких пределах ($700-1500 \text{ мкм}^{-2}$), достигая 2200 мкм^{-2} на неповрежденных участках. Данные работы ⁽¹³⁾ ($1310 \pm \pm 77 \text{ мкм}^{-2}$) укладываются в этот интервал. Частицы наружной поверхности межгранных тилакоидов (н.п.т.м.) исследованной, насколько нам известно, впервые, отличаются большей монодисперсностью (рис. 2Б, а) и еще меньшей средней плотностью упаковки ($400-600 \text{ мкм}^{-2}$). Как на н.п.т.г., так и на н.п.т.м. на участках, с которых слущились крупные частицы, можно обнаружить мелкие ($6-8 \text{ нм}$) частицы (рис. 3а, б — двойные стрелки) с паракристаллической упаковкой с шагом порядка 8 нм .

Наружная поверхность скола тилакоидов гран (н.п.с.г., рис. 3б) усеяна нерегулярно расположенными частицами со средним размером в 16 нм (рис. 2А, б) и плотностью упаковки $1900-2500 \text{ мкм}^{-2}$. В отличие от данных работы ⁽⁶⁾, столь же крупные и даже большие частицы (рис. 2Б, б) со сходной плотностью упаковок ($1200-2300 \text{ мкм}^{-2}$) обнаружены нами на наружной поверхности скола межгранных тилакоидов (н.п.с.м., рис. 3б).

Этот факт ставит под сомнение утверждение (^{6, 12}) о связи частиц размером 16—18 нм с активностью фотосистемы II, не обнаруживаемой в межгруппных тилакоидах (⁶).

Внутренняя поверхность скола обоих типов тилакоидов (в.п.с.г. и в.п.с.м., рис. 3б) заполнена плотно упакованными мелкими частицами. Сравнение гистограмм (рис. 2А, в, 2Б, в) показывает, что средний размер частиц в.п.с.г. и в.п.с.м. примерно одинаков, но спектр первых несколько уже. Средняя плотность упаковки у первых равна 5700 мкм^{-2} , у вторых 4100 мкм^{-2} . Частицы в.п.с.г. иногда проявляют упорядоченное расположение с периодом решетки около 15 нм.

Внутренняя поверхность тилакоидов гран (в.п.т.г.), в отличие от (¹⁰), имеет слабо выраженный рельеф. Внутреннюю поверхность межгруппных тилакоидов мы наблюдали лишь на небольших участках.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют четкое отличие макромолекулярной организации мембран тилакоидов гран и межгруппных тилакоидов хлоропластов. Это находится в согласии с представлением о различии их функциональных ролей и с результатами фотохимических тестов и биохимических определений (¹⁴). В то же время по ряду признаков (например, по деталям строения поверхности н.п.с.) отмечено большое сходства, чем это считалось до сих пор (⁶).

Институт физиологии растений
Академии наук СССР
Киев

Поступило
5 VI 1975

Институт биофизики
Академии наук СССР
Пушино Московской обл.

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Moor, K. Mühlethaler et al., J. Biophys. Biochem. Cytol., v. 10, 1 (1961).
² Б. А. Филте, Э. И. Заичкин, Е. Н. Ратнер, Новые методы физического препарирования биологических объектов для электронно-микроскопических исследований, М., 1973. ³ Я. Ю. Комиссарчик, В сб.: Криогенные методы в электронной микроскопии, Пушино, 1974. ⁴ В. Л. Боровягин, В сб.: Биофизика живой клетки, Пушино, 1974. ⁵ R. B. Park, A. O. A. Pfeiffer, J. Cell Sci., v. 5, 299 (1969). ⁶ R. V. Sane, D. J. Goodchild, R. B. Park, Biochim. et biophys. acta, v. 216, 1, 162 (1970). ⁷ D. Branton, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 20, 209 (1969). ⁸ U. W. Goodenough, L. A. Stachelin, J. Cell Biol., v. 48, 694 (1971). ⁹ E. Guerin-Dumartriat, S. Mihara, A. Moyse, Canad. J. Bot., v. 48, 6, 1147 (1970). ¹⁰ K. Mühlethaler, In: Proc. of the II Intern. Congress on Photosynthesis Res., The Hague, 1972. ¹¹ M. P. Garber, P. L. Steponkus, J. Cell Biol., v. 63, 24 (1974). ¹² R. B. Park, W. G. Nolan, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 227, 58 (1974). ¹³ R. J. Berzborn, F. Kopp, K. Mühlethaler, Zs. Naturforsch., B. 29, 694 (1974). ¹⁴ А. М. Силаева, М. С. Гамаюнова, М. Ю. Григора, В сб.: Фотосинтез кукурузы, Пушино, 1974.