

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ КЛІТИН МЕЗОФІЛУ ТА ШВИДКІСТЬ ФІКСАЦІЇ CO₂ КЛІНОСТАТОВАНИХ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ

© Н. І. Адамчук

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

Порівняльний аналіз структурних параметрів клітин мезофілу і швидкості фіксації CO₂ контрольних і кліностатованих рослин виявив значний вплив чинника на ріст і розвиток арабідопсису. Він проявився у збільшенні розмірів клітин мезофілу і розширенні простору міжклітинників, зниженні вмісту крохмалю в хлоропластах субепідермальних клітин листків кліностатованих рослин, що може бути пов'язано із активним використанням продукту асиміляції на респіраційні процеси та прискорення розвитку експериментальних рослин.

ВСТУП

Фотосинтез є єдиним джерелом первинних органічних сполук, забезпечує енергопластичним матеріалом формотворчі процеси. Співвідношення між ростом та фотосинтетичним забезпеченням ростового процесу постійно змінюється в онтогенезі і залежить від факторів середовища [7]. Одним із визначальних факторів космічного польоту для росту і розвитку рослинних клітин є мікрогравітація [13], що здатна впливати на розміри і організацію клітин мезофілу [6, 8, 13], викликати деструкцію нативної організації хлоропластів [1, 3, 6, 10], зменшення вмісту крохмалю [1, 3, 12].

При апробації космічних досліджень у лабораторних умовах біологічні ефекти мікрогравітації у рослинних клітин викликають методом кліностакування [11]. Протягом наших досліджень було виявлено значний вплив кліностакування на ріст і розвиток рослин арабідопсису та клітин мезофілу [9], ультраструктурну організацію хлоропластів, вміст хлорофілів [13] та фотосинтетичну активність фотомембран [14]. Наступним кроком наших досліджень стала оцінка продуктивності фіксації CO₂ фотосинтетичним апаратом арабідопсису у порівнянні із вмістом крохмалю в хлоропластах клітин мезофілу цієї рослини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом досліджень було обрано ефемер з родини *Brassicaceae* — *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh cv *Columbia*. Рослини *A. thaliana* розвивалися в лабо-

раторних умовах при цілодобовому рівномірному розсіяному освітленні інтенсивністю 8 тис. люкс. Температурний оптимум для рослин складав 23—25 °С. Рослини вирощувалися з семи стерилізованих сумішшю пергідролу і абсолютного спирту (1:1) насінин у високих цукрових склянках діаметром 3 см і заввишки 17 см на агаризованому поживному середовищі Ленгріджа — Квітко [5] на повільному горизонтальному кліностаті (2 об/хв) та у стаціонарному вертикальному контролі.

Для ультраструктурних досліджень відбиралися молоді верхні листки розетки, фіксувалися вирізки центральної міжжилкової частини листової пластинки завширшки в 1 мм у 3-процентному глютаровому альдегіді протягом двох годин на 0.1 М фосфатному буфері при кімнатній температурі. Після промивання матеріалу у вищезазначеному буфері протягом 15 хв матеріал вміщали в розчин OsO₄ на тому ж буфері за тих же умов протягом півтори години. Для поліпшення фіксації і кращого занурення матеріалу вирізки інфільтрувалися. Зневоднення об'єкта проводили в батареї спиртів висхідної концентрації (30, 50, 60, 70, 80, 90 % двічі по 15 хв, 96, 100 % двічі по 30 хв, суміші абсолютного спирту і ацетону (1:1) — 30 хв, ацетоні — двічі по 15 хв). Насичення матеріалу сумішшю епоксидних смол і ацетону у відповідних співвідношеннях об'ємів здійснювалося у три прийоми: 1:3, 1:1, 3:1. Далі матеріал вміщувався у ретельно перемішану суміш епоксидних смол: епон 812 — 9 мл, DDSA — 12 мл, Аралдит М — 9 мл, DMP — три краплі. Матеріал полімеризувався при 37 °С одну добу і дві доби при 63 °С. Повторюваність дослідів трикратна.

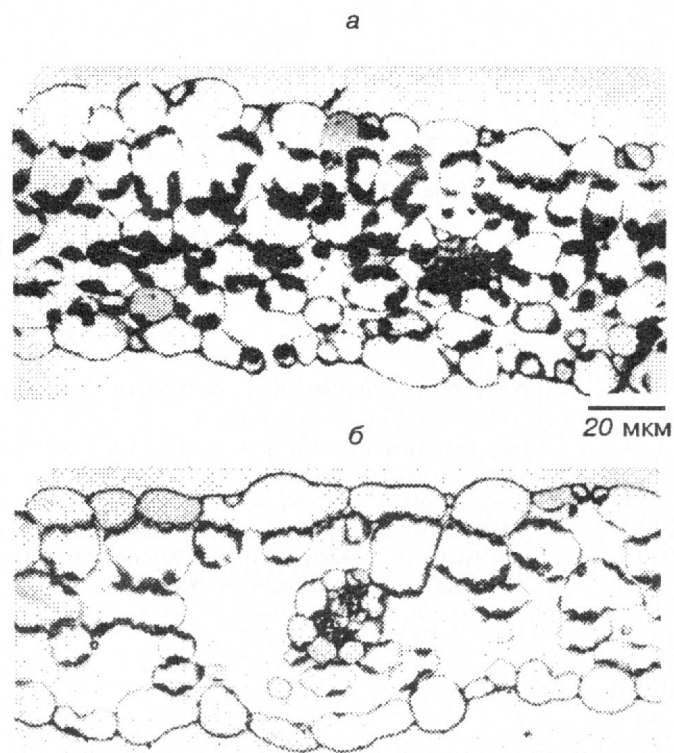
Препарати для світлової мікроскопії завтовшки в 1 мкм виготовлялися за допомогою ультрамікротому типу LKB, фарбувалися метиленовою синькою і розглядалися у світловому мікроскопі NU-2. Зрізи для електронно-мікроскопічного аналізу нарізалися на тому ж мікротомі і знімалися на формварову підложку, контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом і вивчалися в трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1200EX. Морфометричні вимірювання проводилися за методикою, наведеною в роботі [4]. Статистична обробка даних виконувалася за стандартною програмою STAT. Сушу вагу листків отримували після п'ятикратного прогрівання об'єкта при температурі 80 °С в термостаті. Повторюваність дослідів п'ятикратна. Швидкість фіксації CO_2 визначалася радіобіологічним методом за насиченням фондів метаболітів $^{14}\text{CO}_2$.

Устаткування для роботи з ізольованим листом: камера для листків з вентиляцією, термостатована і фотостатована відповідними джерелами, газгольдер із запасом газової суміші з $^{14}\text{CO}_2$, два компресори, два реометри, поглинач залишку $^{14}\text{CO}_2$, система генерації $^{14}\text{CO}_2$ і зарядки газгольдера.

М'який газгольдер наповнювався повітрям з $^{14}\text{CO}_2$ так, щоб газова суміш мала потрібну концентрацію CO_2 (0.035 %) і питому активність (25 мілікюри на літр CO_2). Компресор забезпечував подачу газової суміші у камеру з листям, де відбувається інтенсивне перемішування повітря вентилятором. Швидкість току повітря встановлювали за реометром на рівні 1.5—2.0 л/хв у розрахунок на 1 дм^2 поверхні листка. На виході із камери залишок $^{14}\text{CO}_2$ вловлюється поглиначем. Після експозиції в $^{14}\text{CO}_2$ і фіксації в парах киплячого етанолу (80 %) листя підлягало радіохімічному аналізу з використанням двовимірної радіоавтографії.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

На 28-му добу експерименту рослини арабідопсису досягали фази кінця цвітіння початку плодоносіння. У кліностатованих рослин формування квітів та закладання плодів спостерігалось на 2 доби раніше, ніж у контролі. Висота рослин становила 11—17 см. Стебла дослідних рослин мали покручену форму. Асиміляційний апарат об'єкта складався з 5—9 листків розетки і 3—5 сидячих листків стебла. Листки розетки набували ланцетовидної форми, але з розширеним дистальним кінцем, який закінчувався невеличкими зубцями. Детальний аналіз особливостей морфолого-анатомічної організації надземних органів арабідопсису, що розвивалися в умовах кліностатування представлені у нашій по-



Поперечні зрізи листків розетки рослин арабідопсису, 20 мкм: а — контроль, б — кліностатування

передній роботі [2]. На поперечних зрізах листкової пластинки 7-го та 8-го листків розетки (рисунк) висотою 63.7 ± 5.4 мкм розрізнялися шари абаксiального і адаксiального епiдермiсу, які мали неправильну подовжену форму і подекуди прoдихи між ними. Між епiдермальними шарами розташовувалося 3—5 шарів різноманітної форми і переважно кулястих клітин мезофілу завширшки 44.7 ± 4.3 мкм. На 10^4 мкм² площі зрізу припадало 20—40 клітин мезофілу у контролі і зменшувалася до 5—17 клітин у експериментальному варіанті, що виникало завдяки збільшенню об'єму клітин та розширенню міжклітинників (таблиця). Зміни в розмірі клітин мезофілу корелювали зі збільшенням кількості хлоропластів в них за умов кліностатування до 33.5 ± 2.6 органел у порівнянні із контрольною кількістю 24.0 ± 3.3 . Об'єми хлоропластів в обох варіантах суттєво не відрізнялись і складали 46.6 ± 4.6 мкм³ у контролі та 40.2 ± 4.6 мкм³ при кліностатуванні. Найсуттєвіші ультраструктурні зміни, викликані умовами кліностатування, стосувалися розвитку системи тилакоїдів. У кліностатованих рослин об'єм фотосинтетичних мембран був рівний 16.22 ± 0.52 мкм³ а у

Відносні об'єми структурних компонентів мезофілу листків 28-добових рослин арабідопсису на 10^4 мкм³, $n = 50$, $*p = 0.05$

Структура	Об'єм, %	
	Контроль	Кліноостатування
Клітини мезофілу	59.6±3.4	38.4±4.3
Клітинна стінка	7.2±0.5	1.5±0.2
Ядро	2.1±0.3	1.2±0.1
Вакуоль	35.8±4.2	28.6±3.6
Пластидом	10.9±1.5	4.4±0.2
Цитоплазма з органелами	3.2±0.4	2.8±0.3
Міжклітинний простір	38.02±0.7	57.81±7
Обкладка провідних пучків	2.1±0.9	3.8±0.4

контрольних — 14.71 ± 0.90 мкм³ переважно за рахунок розвитку стромальних тилакоїдів. Вміст строми і пластоглобулярних включень збільшувався в хлоропластах дослідних рослин в 1.63 рази пропорційно до об'єму фотомембран. Накопичення пластоглобул в хлоропластах дослідних рослин може бути проявом посиленої акумуляції нейтральних ліпідів. Вміст крохмалю в хлоропластах субепідермальних клітин за експериментальних умов був майже втричі меншим (10.74 ± 1.33 %), ніж у контролі (32.77 ± 7.05 %), що цілком відповідає даним космічних досліджень [1, 3, 12]. Зменшення вмісту крохмалю може бути спричинене або зменшенням його синтезу, або посиленням гідролітичних процесів. Проте у кліноостатованих рослин виявлено збільшення швидкості фіксації CO₂ — 4.53 нмоль CO₂/г у порівнянні із контрольним варіантом — 3.61 нмоль CO₂/г. Наявність великої кількості крохмалю в контролі гальмує активність фіксації CO₂. А зменшення крохмалю в хлоропластах рослин, що зростали в умовах зміни сили тяжіння, частково викликано посиленням респіраційних процесів [15] або його більшим використанням на прискорення ростових процесів у кліноостатованих рослин.

1. Абилов З. К., Алиев А. А., Алекперов У. К., Машинский А. Л. Исследование функциональных и морфологических особенностей фотосинтетического аппарата проростков гороха, в течение 42 суток культивируемых на станции «Салют-7» // Докл. АН Аз ССР.—1986.—42, № 8.—С. 68—71.
2. Адамчук Н. І. Морфолого-анатомічні зміни надземних органів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. при кліноостатуванні // Укр. ботан. журн.—1998.—55, № 6.—С. 588—591.
3. Алиев А. А., Алекперов У. К., Машинский А. Л. и др.

Ультраструктурные и физиологические особенности фотосинтетического аппарата гороха, культивируемого 29 дней на орбитальной станции «Салют-7» // Изв. АН АзССР. Сер. Биология.—1985.—6.—С. 18—23.

4. Васильев А. Е., Муравник Л. Е. Динамика клеточных компонентов тканей листа *Populus deltoides* (Salicaceae) в ходе жизненного цикла. Палисадный мезофилл в ходе роста // Биологический журн.—1997.—82, № 9.—С. 1—13.
5. Иванов В. И. Радиобиология и генетика арабидопсиса // Пробл. космической биологии.—1974.—24.—С. 28—50.
6. Кордюм Е. Л., Ваулина Э. Н., Гречко Г. М. и др. Изучение скорости биологического процессов в условиях микрогравитации и клиноостатирования.—Киев, 1989.—39 с. (Препринт).
7. Мокроносов А. Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза.—М.: Наука, 1981.—196 с.
8. Недуха Е. М., Кордюм Е. Л., Нечитайло Т. С. Влияние 16-суточного космического полета на ультраструктуру клеток листьев пшеницы *Triticum durum* (L.) — Киев. 1991.—11 с. (Рукопись деп. в ВИНТИ 08.01.91, № 138-B91).
9. Adamchuk N. I. Ultrastructural and functional changes of photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. induced by clinorotation // Adv. Space Res.—1998.—21, N 8.—P. 1131—1134.
10. Adamchuk N. I., Mikhailenko N. F., Zolotareva E. K., et al. Spaceflight effects on structural and some biochemical parameters of *Brassica rapa* photosynthetic apparatus // J. Grav. Physiol.—1999.—6, N 1.—P. 95—96.
11. Brown A. H., Dahl A. O., Chapman D. K. Morphology of *Arabidopsis thaliana* grown under chronic centrifugation and on the clinostat // Plant Physiol.—1976.—57.—P. 358—364.
12. Brown C. S., Oberland D. M., Musgrave M. E. Space flight effects on growth, carbohydrate concentration and chlorophyll content in *Arabidopsis* // ASGSB Bulletin.—1993.—7.—P. 83.
13. Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. of Cytology.—1997.—142.—P. 305—340.
14. Kordyum E. L., Adamchuk N. I. Clinorotation affects the state of photosynthetic membranes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // J. Grav. Physiol.—1997.—4(2).—P. 77—78.
15. Tripathy B. C., Brown C. S., Levin H. G., Krikorian A. D. Growth and photosynthetic responses of wheat plants grown in space // Plant Physiol.—1996.—110.—P. 801—806.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF MESOPHYLL CELLS AS WELL AS CO₂-ASSIMILATION RATE IN CLINOROTATED ARABIDOPSIS PLANTS

N. I. Adamchuk

The comparative analysis of structural parameters of mesophyll cells and CO₂-assimilation rate for the control and clinorotated plants revealed the essential alterations in growth and development of *Arabidopsis*. This influence resulted in increase of mesophyll cells volume and intercellular space, in decrease of starch inclusion in the mesophyll subepidermal chloroplasts, which may be partially due to their higher respiration rates and growth activation of experimental plants.