

УДК 663.543.002

Н. И. Адамчук-Чалая

Институт ботаники ім. Н. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Влияние клиностатирования на фотосинтетический аппарат семисуточных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Проведено порівняльне структурно-функціональне і біохімічне дослідження перших листків розетки 7-добових паростків *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в умовах повільного горизонтального кліно-статування 2 об./хв та стаціонарного вертикального контролю. При кліно-статуванні процес злиття вакуолей клітин мезофілу відбувається швидше, збільшується парціальний об'єм хлоропластів у клітині та сумарна довжина їхніх фотомембран, фотохімічні та обмінні реакції в них проходять інтенсивніше. Отримані результати свідчать про те, що за умов кліно-статування відбувається стресова стимуляція їхнього розвитку.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря детерминированности органов зародыша семени морфогенез на начальных стадиях развития проростков в условиях изменения силы тяжести происходит нормально. Однако самые разные по своей функциональной специализации клетки растений способны реагировать на изменение действия гравитационного вектора комплексом ультраструктурных перестроек и биохимических реакций [3, 4, 6, 7].

Согласно данным работы [5] структурно-функциональные изменения в клетках мезофилла семядолей *Brassica rapa* на седьмой день космического полета свидетельствовали об увеличении количества и размеров хлоропластов и митохондрий. Иммуноцитохимический анализ с использованием антител (anti-PsaA_N, anti-PsaB_c and anti-LHCI) подтвердил нарушения в образовании комплексов фотосистемы I в условиях микрогравитации. Пигмент-белковые комплексы фотосистемы I главным образом сосредоточены в тилакоидах стромы. В ходе наших предыдущих исследований был выявлен эффект увеличения парциального объема этих фотомембран в хлоропластах семядолей проростков арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) [1] и зачаточных листьях 7-суточных проростков гороха [2], выращенных в условиях клиностатирования, метода, который вызывает у растений биологиче-

ские эффекты микрогравитации. Однако детального изучения изменений организации фотомембран в процессе развития листовой пластинки при клиностатировании до нашего исследования не проводилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проростки *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. выращивали 7 суток из стерилизованных смесью пергидроля и абсолютного спирта семян на агаризованной питательной среде Ленгриджа — Квитко при 16-часовом рассеянном освещении 8000 люкс в условиях медленного горизонтального клиностатирования (2 об./мин) и в стационарном вертикальном контроле (рис. 1). Приготовление препаратов для структурного анализа в световом микроскопе NU-2 и электронном трансмиссионном микроскопе JEM 1200-EX осуществлялось по методу, описанному в работе [1]. Исследованию подлежали клетки мезофилла первых листьев розетки *A. thaliana*, которые пребывали на стадии деления (I) или формирования центральной вакуоли (II), как указано на рис. 2. Было изучено более 300 клеток палисадного мезофилла для каждого варианта. Парциальные объемы хлоропластов в клетке измеряли с помощью стекол Стефанова со случайным шагом в 100 нм, длину фотомембран — курвиметром.

Рис. 1. Семисуточные проростки *A. thaliana*, контроль. Стрелкой указаны первые листья

Рис. 2. Продольный срез первого листа розетки 7-суточного проростка *A. thaliana*: I — клетки мезофилла с отдельными вакуолями в цитоплазме, II — клетки мезофилла с началом процесса слияния вакуолей, 30 мкм

Рис. 3. Фрагменты клеток мезофилла первых листьев розетки 7-суточных проростков *A. thaliana*: а — контроль, б — клиностатирование, Я — ядро, Хп — хлоропласт, М — митохондрия, В — вакуоль, 1 мкм

Рис. 4. Хлоропласт клетки мезофилла клиностатированного проростка *A. thaliana*: КО — клеточная оболочка, М — митохондрия, ТС — тилакоиды стромы, МпТ — миелоноподобное тело, ППР — периферический пластидный ретикулум, 500 нм. Стрелкой указано уплотнение рибосом цитоплазмы

Измерение спектров флуоресценции гомогенатов листьев *A. thaliana* и хлоропластов проводили на установке отдела биохимии фотосинтеза Института физиологии растений и генетики НАН Украины с использованием разработанных в отделе методик. Выделение хлоропластов и субхлоропластных частиц проводили в среде, содержащей 0.6М фосфатный буфер и 0.5М сахарозу (рН 7.0). Растертые гомогенаты процеживали сквозь капроновую ткань и центрифугировали 5 мин при перегрузке 100—200 g для осаждения фрагментов клеток, зерен крахмала и др. Полученный супернатант еще раз центрифугировали 10 мин при 1000—2000 g, осаждая фракцию хлоропластов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ростовые эффекты исследованных проростков *A. thaliana*, дезориентация части проростков в условиях клиностатирования были описаны нами в предыдущей публикации [1], посвященной изучению структурно-функциональных изменений клеток мезофилла семядольных листьев при клиностатировании. В нашей работе был проведен сравнительный анализ формирования фотосинтетического аппарата на ранней фазе развития проростков *A. thaliana* при клиностатировании и в контроле (рис. 1). Листья исследованных проростков достигли лишь 1/3 своей окончательной величины, и поэтому клетки мезофилла в них находились на стадии деления (I) или формирования центральной вакуоли (II), как указано на рис. 2.

В контрольном варианте количество клеток стадии I составляло 52.07 ± 2.04 % от общего числа просмотренных клеток, II — 48.33 ± 3.40 %, а при клиностатировании — 32.52 ± 3.23 % и 68.11 ± 7.14 % соответственно. Таким образом, большую часть исследованных клеток контрольных проростков составляли клетки, проксимальную часть которых занимало ядро с незначительным уплотнением конденсированного хроматина в кортикальном слое. В насыщенной рибосомами цитоплазме клеток обоих вариантов по всему объему размещались хлоропласты длиной 2—3 мкм и шириной 0.5—2 мкм, митохондрии, элементы эндоплазматического ретикулума, представленного цистернами гранулярного и агранулярного типа и редко встречающиеся диктиосомы (рис. 3). По частоте встречаемости и параметрам митохондрий достоверных отличий между вариантами определено не было. Большую часть исследованных клеток клиностатированных проростков составляли клетки, где наблюдался процесс слияния вакуолей (рис. 3, б).

Ультраструктурные показатели развития фотосинтетического аппарата первых листьев розетки 7-суточных проростков *A. thaliana*

Условия роста	Парциальный объем хлоропластов в клетке, %	Суммарная длина фотомембран, мкм
Контроль	$13.42 \pm 1.16^*$	51.80 ± 2.23
Клиностатирование	21.96 ± 1.48	58.40 ± 2.32

* $p \leq 0.05$

Только у клеток мезофилла клиностатированных проростков было определено достоверное увеличение парциального объема ювенильных хлоропластов и развития фотомембран в них за счет увеличения их суммарной длины (таблица). Поскольку по линейным параметрам хлоропластов наблюдалась лишь тенденция к удлинению в экспериментальном варианте, главной причиной увеличения парциального объема хлоропластов при клиностатировании является большее их количество в клетке мезофилла за счет более быстрого деления этих органелл в условиях опыта.

Линзовидные зерна крахмала формировались лишь у проростков, выросших при клиностатировании (рис. 3, б). Это указывало на то, что в экспериментальных условиях осуществляется более быстрый синтез первичных углеводов ассимилятов, отток которых не происходит по причине отсутствия зрелых элементов проводящей системы в мелких жилках листа на ранней стадии развития.

В местах контакта хлоропластов клиностатированных проростков с хлоропластами и митохондриями формировались миелоноподобные тела. В отличие от контрольных хлоропластов эти органеллы у клиностатированных проростков характеризовались активизацией элементов периферического ретикулума хлоропластов и возникновением локальных уплотнений популяции рибосом цитоплазмы возле хлоропластов (рис. 4), что в свою очередь отражает усиление обмена между стромой хлоропластов и цитоплазмой в экспериментальных условиях.

Определено коротковолновое отклонение максимумов флуоресцентной эмиссии гомогенатов листьев *A. thaliana* (рис. 5), что указывало на интенсификацию фотохимических реакций в условиях клиностатирования.

Сравнивая полученные результаты с данными других исследований, следует отметить, что биологические эффекты микрогравитации, вызванные клиностатированием, в первую очередь влияют на фотосинтетический аппарат проростков *A. thaliana*, а именно на парциальный объем хлоропластов в клетке мезофилла, за счет более быстрого, чем в

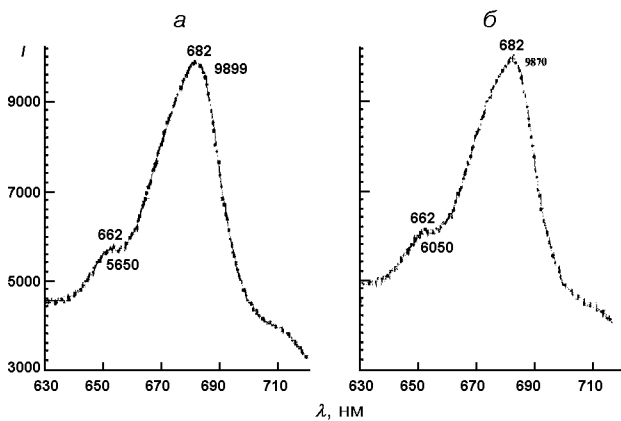


Рис. 5. Спектры возбуждения длинноволновой флуоресценции гомогенатов первых листьев розетки 7-суточных проростков *A. thaliana*

контроле, деления хлоропластов и увеличения их количества в клетке. В отличие от данных [5] мы не обнаружили достоверных изменений количества и параметров митохондрий при клиноротации проростков *A. thaliana*, что свидетельствует о более широком спектре действия условий космического полета на организацию и функционирование ассимилирующих клеток проростков. Приведенные в указанной работе данные о нарушении формирования комплексов фотосистемы I под действием микрогравитации прежде всего касаются пигмент-белковых комплексов, составляющих тилакоиды стромы. Подобный эффект отмечался и в наших предыдущих работах по клиноротации различных растений [1, 2]. Однако происходящее при клиноротации увеличение суммарной длины фотомембран способствует не только компенсации подобных нарушений в раннем периоде развития проростков, но и может вызвать повышение интенсивности фотохимических реакций, представленных на спектрах флуоресценции (рис. 5). На усиление реакций метаболизма клеток мезофилла и их основной функциональной органеллы — хлоропласта в экспериментальных условиях указывает активизация элементов периферического пластидного ретикулаума и локальное уплотнение популяции рибосом цитоплазмы возле хлоропластов (рис. 4) в результате усиления обмена между стромой хлоропластов и цитоплазмой. Преобладание у клиноротированных проростков клеток мезофилла со сливающимися вакуолями, в отличие от контроля, где большая часть клеток содержала отдельные маленькие вакуоли, свидетельствует об ускорении процесса формирования центральной вакуоли и перехода клеток к росту растяжением.

ВЫВОДЫ

В результате сравнительного структурно-функционального и биохимического исследования первых листьев розетки 7-суточных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в условиях медленного горизонтального клиноротирования (2 об./мин) и стационарного вертикального контроля было определено, что при клиноротировании клетки мезофилла быстрее формируют центральную вакуоль, увеличивается парциальный объем хлоропластов в клетке мезофилла и суммарная длина их фотомембран, фотохимические и обменные реакции в них происходят интенсивнее. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях клиноротирования происходит стрессовая стимуляция развития проростков *A. thaliana*.

Работа выполнена при поддержке гранта № 349-Б Президиума НАН Украины.

1. Адамчук Н. И. Будова сім'ядольного листка *Arabidopsis thaliana* cv *Columbia* в умовах кліноротування // УБЖ.—1995.—52, № 5.—С. 605—610.
2. Адамчук Н. И. Зміни структурно-функціональної організації клітин мезофілу гороху за умов кліноротування // Физиология и биохимия культ. растений.—1999.—31, № 4.—С. 266—269.
3. Claassen D. E., Spooner B. S. Impact of altered gravity on aspects of cell biology // *Int. Rev. Cytol.*—1994.—156.—P. 301—373.
4. Halstead T. W., Dutcher F. R. Plants in space // *Annu. Rev. Plant Physiol.*—1987.—38.—P. 317—345.
5. Jialo S., Hilare E., Paulse A. Q., Guikema J. A. Ultrastructural observation of altered chloroplast morphology in space-grown *Brassica rapa* cotyledons // *J. Gravit. Physiology.*—1999.—6, N 1.—P. 93—94.
6. Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinorotation // *Int. Rev. Cytol.*—1997.—171.—P. 1—78.
7. Kordyum E. L. Space biology and medicine: conception and experimental data // *Space research in Ukraine 2000—2002* / Ed. O. Fedorov. — National Space Agency of Ukraine: Prin. House KIT, 2002.—P. 52—62.

INFLUENCE OF CLINOROTATION ON THE PHOTOMEMBRANES OF 7-DAYS *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. SEEDLINGS

N. I. Adamchuk-Chala

Comparative structural, functional and biochemical investigations of first true leaves of 7-day *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. seedlings under conditions of slow horizontal clinorotation (2 prm) and station control are performed. Formation of central vacuole is fasted by clinorotation, partial volume of chloroplasts in a cell and summary length of photomembranes are increased under clinorotation. Their photochemical and change reactions through out more intensively. The results of our calculations indicate that stress stimulation of seedling growth takes place under clinorotation conditions.