

© Н. І. Адамчук-Чала

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

## ВПЛИВ КЛИНОСТАТУВАННЯ НА ТРАНСФОРМАЦІЮ ЕТІОПЛАСТІВ В ХЛОРОПЛАСТИ ПАРОСТКІВ ЯЧМЕНЮ

Досліджувався вплив клиностатування на структурні показники пластид зеленіючих проростків ячменю сорту «Зоряний». Порівняльний аналіз динамічних ультраструктурних змін пластид контрольних і клиностатованих зеленіючих проростків показав такі відхилення у метаморфозі хлоропластів: зменшення об'єму пластид у варіанті 15 хв освітлення, зменшення площі проламеллярного тіла у варіанті 1 год освітлення, скорочення довжини ламел, розвинутих із нього у варіантах 1 і 3 год освітлення. В умовах контролю після трьох годин освітлення формувались етіохлоропласти, після 6 год — хлоропласти. При клиностатуванні і освітленні 6 год розвивались лише етіохлоропласти. Оговорюються можливі механізми затримки трансформації етіопластів у хлоропласти в умовах клиностатування.

### ВСТУП

Завдяки проведенню біокосмічних експериментів протягом останніх десятиліть переконливо доведено, що рослинні клітини різного типу є гравічутливими. Дослідження гравічутливості клітин мезофілу виконували або на етіюльованих паростках [4], або на паростках, що розвивалися в умовах освітлення [1, 2]. В наших попередніх дослідженнях [5] було проведено вивчення впливу кліностатування на морфологічні характеристики та синтез головних пігментів листків ячменю протягом першої доби зеленіння. Проте відкритими залишилися питання — які структурні зміни пластид в процесі зеленіння викликає клиностатування і як воно впливає на формування фотосинтетичних мембран.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктами експерименту були обрані рослини ярого ячменю сорту «Зоряний». Паростки вирощували в горщиках на базальтовому волокні при температурі 20—24 °С у стаціонарному вертикальному контролі та при повільному горизонтальному клиностатуванні 2 об./хв. Щодоби здійснювався одноразовий полив паростків 9 % розчином екстракту вермістиму (1 мл на паросток). Паростки зростали 5 діб у темряві з наступним освітленням 0,25, 0,5, 1, 3 та 6 год люмінесцентними лампами інтенсивністю розсіяного світла 6 тис. люкс, як було рекомендовано в роботі [8]. Показники субструктурної організації хлоропластів клітин мезофілу першого

ряду від адаксіальної епідерми визначали за електронограмами, відзнятими на електронному трансмісійному мікроскопі JEM 1200 EX із застосуванням лінійних (за допомогою масштабної лінійки та курвиметра) морфометричних вимірів і обчислення параметрів, об'єм пластид та парціальний об'єм місць локалізації хлоропластної ДНК визначали у програмі Image Tool.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ОБГОВОРЕННЯ

Умови клиностатування викликали дезорієнтацію паростків ячменю протягом їхнього розвитку із насіння на приладі. Подібний ефект спостерігався в наших дослідженнях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [1, 2]. Причини дезорієнтації паростків в умовах зміни сили тяжіння розглянуті в роботах [7, 10].

Процес зеленіння паростків ячменю відбувався відповідно до схеми онтогенезу хлоропластів Фрей-Вісслінга і Мюлеталера [6]. Ультраструктурна організація клітин адаксіального епідермального шару та субепідермального шару мезофілу була типовою для клітин мезофілу етіюльованих паростків [9]. Пропластиди субепідермальних клітин мали ультраструктурну організацію, характерну для цього виду пластид, що цілком узгоджується з моделлю Вейера і Брауна [11]. Згідно з цією моделлю проламеллярне тіло пластид етіюлянтів являє обою трубчасто-ратову структуру, модулем якої є шестикутник. Під дією світла з проламеллярного тіла розвиваються ламели, що диференціюються на ламели строми і ламели гран. Параметри пластид

після 15 хв освітлення представлені в табл. 1. На третю годину зеленіння об'єм контрольних етіохлоропластів змінювався з  $23.42 \pm 2.26$  мкм<sup>3</sup> до  $19.88 \pm 1.52$  мкм<sup>3</sup> при клиностатуванні. Хлоропласти виявлялися лише на шосту годину зеленіння, і тільки у контрольних паростків, що свідчило про затримку процесу зеленіння в умовах зміни сили тяжіння. Розміри хлоропластів контрольних паростків були  $45.35 \pm 1.60$  мкм<sup>3</sup>, пластид при кліностатуванні —  $39.24 \pm 1.58$  мкм<sup>3</sup>.

Світловий стимул є головним фактором трансформації етіопластів в хлоропласти, що активує розвиток ламел — попередників фотомембран. На поперечному зрізі етіопластів та етіохлоропластів (рис. 1) виявлялися «паракристалічні» проламелярні тіла і система паралельних ламел, що розвивалися з них. Строма пластид містила електроннопрозорі ділянки локалізації пластидної ДНК та канали периферійного пластидного ретикулу. Дані зміни параметрів субструктурних елементів пластид на різних етапах процесу зеленіння представлені в табл. 2. Параметри ультраструктурної організації пластид паростків після 15- та 30-хв освітлення характеризувалися відсутністю достовірної різниці між варіантами контролю і досліду.

Процес розвитку ламел в умовах кліностатування гальмувався. Строма етіохлоропластів протягом зеленіння характеризувалася неоднорідністю. Вирізнялися електроннопрозорі місця локалізації пластидної ДНК. Щільність популяції рибосом в стромі досліджуваних пластид коливалася від 15—30 одиниць на 100 нм<sup>2</sup> та зростала у процесі

зеленіння до 30—55 одиниць на 100 нм<sup>2</sup>. Також для пластид клиностатованих зеленіючих паростків характерне збільшення каналців периферійного пластидного ретикулу, що утворювалися із інвазією внутрішньої мембрани оболонки пластиди.

Таким чином, впродовж зеленіння паростків при клиностатуванні параметри пластид зменшувалися (табл. 1) за рахунок скорочення поперечної осі пластид. Відповідно зменшувався і їхній об'єм. Цей ефект скоріш за все виникає ще під час ділення пропластид, проте спосіб реплікації етіопластів досі залишається мало вивченим. Етіопласти зеленіючих паростків містять проламелярне тіло у вигляді впорядкованого «пара кристалічного» центру каналів, що після належної світлової стимуляції змінюють свою орієнтацію та перетворюються у паралельні ламели. Ці внутрішні мембрани етіопластів і етіохлоропластів замість хлорофілу містять протохлорофіл (жовтий попередник хлорофілу) [3] та моногалактозилдіацилгліуерол (МГДГ) [8]. Автори обговорюють залежність функціонування мономерної форми світлозбиральних комплексів другої фотосистеми від вмісту МГДГ та звертають особливу увагу на значення чіткої білок-білкової та білок-ліпідної взаємодії в нативних тилакоїдах в перші фази зеленіння паростків ячменю. Вони ідентифікували дві родини білків ранньої світлової індукції мол. масою в 13—14 та 17—19 kDa, що беруть участь у трансформації етіопластів в хлоропласти, та є неспецифічно чутливими до зовнішнього впливу.

Аналізуючи результати наших дослідів, можна відмітити, що на рівні субструктурної організації пластид вплив чинника позначився на ступені розвитку проламелярних тіл, ламел та периферійного пластидного ретикулу (табл. 2). Оцінюючи динаміку цих змін у пластидах зеленіючих контрольних паростків ячменю, можна визначити такі закономірності: площа проламелярних тіл вірогідно зменшувалася (достовірність на першу годину зеленіння), на третю годину освітлення площа проламелярних тіл різко зменшувалася у контролі. Довжина ламел впродовж зеленіння повільно зростала

Таблиця 1. Параметри етіопластів субепідермальних клітин мезофіму етіюльованих паростків ячменю

Параметр	Контроль	Клиностатування
Повздовжня вісь, мкм	$3.84 \pm 0.93$	$3.66 \pm 0.83$
Поперечна вісь, мкм	$2.38 \pm 0.12$	$2.06 \pm 0.11^*$
Об'єм, мкм <sup>3</sup>	$19.53 \pm 1.45$	$17.96 \pm 1.43$

$p \leq 0.05$

Таблиця 2. Параметри елементів субструктурної організації пластид зеленіючих паростків ячменю

Показник	15 хв		30 хв		1 год		3 год	
	К	Кл	К	Кл	К	Кл	К	Кл
Площа проламелярного тіла, мкм <sup>2</sup>	$0.76 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.05$	$0.79 \pm 0.03$	$0.66 \pm 0.09$	$0.75 \pm 0.08$	$0.50 \pm 0.03$	$0.37 \pm 0.05$	$0.53 \pm 0.08$
Довжина ламел, мкм	—	—	$1.37 \pm 0.09$	$1.25 \pm 0.08$	$2.69 \pm 0.04$	$1.29 \pm 0.07$	$3.87 \pm 0.11$	$1.63 \pm 0.07$
Кількість каналів периферійного пластидного ретикулу на зріз пластиди	$2.76 \pm 0.23$	$3.43 \pm 1.04$	$5.65 \pm 0.03$	$6.21 \pm 1.04$	$2.57 \pm 0.39$	$8.04 \pm 1.17$	$1.21 \pm 0.96$	$9.63 \pm 2.98$

$p \leq 0.05$ ; К — контроль, Кл — клиностатування

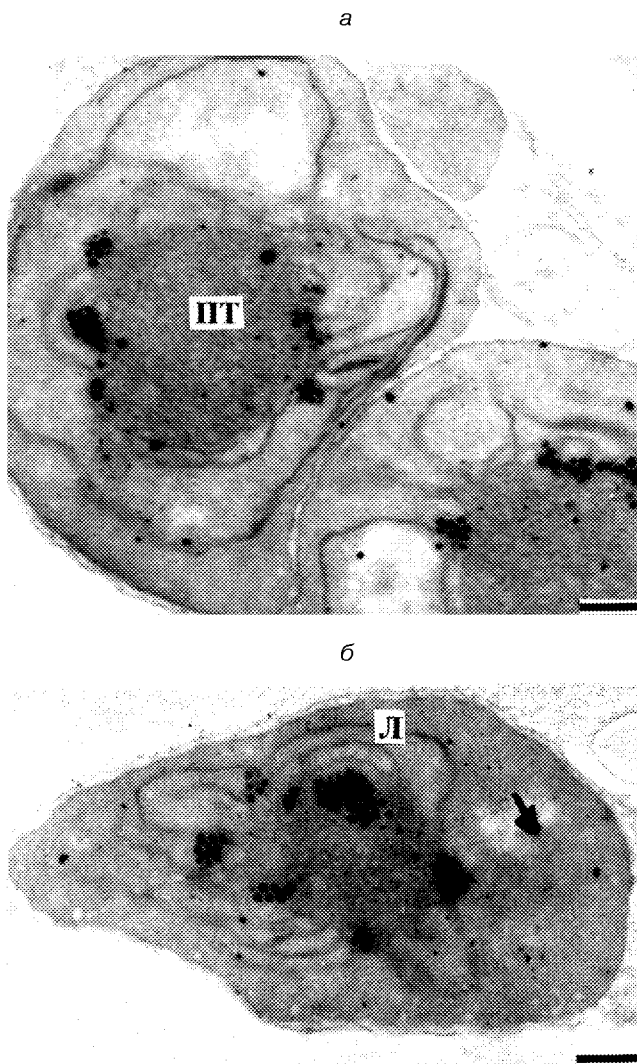


Рис. 1. Етіопласти субепідермальної клітини мезофілу 5-добових контрольних паростків ячменю після першої години зеленіння: *a* — контроль, *b* — клиностатування, ПТ — протоламелярне тіло, Л — ламели, стрілкою вказане електроннопрозоре місце локалізації пластидної ДНК, 100 нм

і була значно меншою від контрольного значення. На зрізах пластид першої години зеленіння клиностатованих паростків канали периферійного пластидного ретикулулу спостерігалися частіше.

Пластиди варіантів шостої години зеленіння не підлягають порівнянню через значну якісну гетерогенність популяції пластид контрольного і клиностатованого варіантів (рис. 2). Система фотомембран, що диференціюється на тилакоїди гран і тилакоїди строми, формувалася лише у хлоропластів контролю. В клітинах клиностатованих зеленіючих паростків розвивалися лише етіохлоропласти, фото-

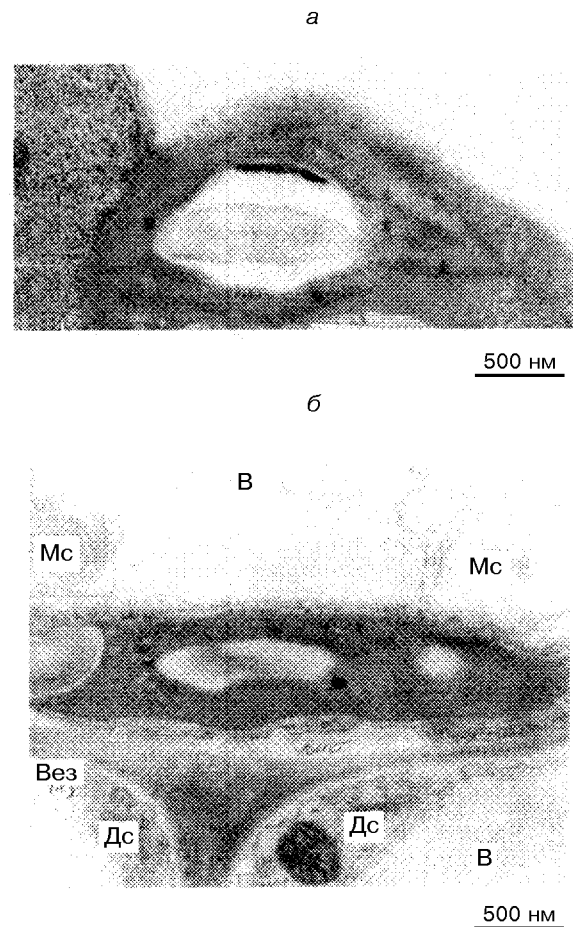


Рис. 2. Пластиди клітини мезофілу 5-добових паростків ячменю після шести годин зеленіння: *a* — контроль, *b* — клиностатування, В — вакуоль, Мс — мезосоми, Дс — диктіосоми, Вез — везикули

мембрани яких були представлені частково розширеними ламелами (рис. 2). Цей ефект вказує на те, що клиностатування затримує процес трансформації пластид у хлоропласти, які спостерігалися тільки у популяції пластид контрольного варіанту.

## ВИСНОВКИ

Порівняльний аналіз динамічних ультраструктурних змін пластид контрольних і клиностатованих зеленіючих паростків показав такі відхилення морфогенезу хлоропластів: зменшення об'єму пластид у варіанті 15 хв освітлення, зменшення площі проламелярного тіла у варіанті 1 год освітлення, скорочення довжини ламел, що розвиваються з нього, у варіантах 1 і 3 год освітлення. В умовах

контролю після трьох годин освітлення формувалися етіопласти, після шести годин — хлоропласти. При клиностатуванні освітленні 6 годин розвивалися лише етіохлоропласти. Можливі механізми затримки формування хлоропластів із етіопластів-етіохлоропластів за умов клиностатування: на рівні пластиди — гальмування розвитку системи ламел; на рівні фотомембран — зміна співвідношення високомолекулярних і відносно низькомолекулярних поліпептидів, синтез яких закодований в гені пластиди.

1. Адамчук Н. І. Будова сім'ядольного листка *Arabidopsis thaliana* cv *Columbia* в умовах клиностатування // Укр. ботанічний журн.—1995.—52, № 5.—С. 605—610.
2. Адамчук Н. І. Влияние клиностаტიрования на фотосинтетический аппарат семисуточных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh.* // Космічна наука і технологія. Додаток.—2003.—9, № 2.—С. 44—47.
3. Гелстон А., Девис И., Сеттер Р. Жизнь зеленого растения. — М.: Мир, 1983.—552 с.
4. Недуха Е. М., Кордюм Е. Л., Филипенко В. Н., Чучкин Ж. А. Влияние микрогравитации на клеточные оболочки надземных органов проростков *Impatiens balsamina* L. — М., 1991.—22 с.—(Рукопись деп. в ВИНТИ; № 137-В).
5. Сиваш О. О., Адамчук Н. І., Повхан М. Ф., та ін. Вплив мікрогравітації на ріст та синтез пігментів етіольованих паростків ячменю // Наук. вісник НАУ.—2000.—32.—С. 165—170.
6. Фрей-Висслинг А., Мюлеталер К. Ультраструктура растительной клетки. — М.: Мир, 1968.—408 с.

7. Hoson T., Soga K., Mori R., et al. Morphogenesis of rice and arabidopsis seedlings in space // J. Plant Res.—1999.—112.—P. 477—486.
8. Kota Z., Hovath L. I., Droppa M., et al. Protein assembly and heat stability in developing thylakoid membranes during greening // PNAS.—2002.—99, N 19.—P. 12149—12154.
9. Kutchera U. The biophysical basis of cell elongation and organ maturation in coleoptiles of rye seedlings: implications for shoot development // Plant Biology.—2004.—6.—P. 158—164.
10. Ueda J., Miyamoto K., Yuda T. Growth and development, and auxin polar transport in higher plant under microgravity conditions in space: BRIC-AUX on STS-95 Space Experiment // J. Plant Res.—1999.—112.—P. 487—492.
11. Weier T. E., Brown D. L. Formation of the prolamellar body in 8-day, dark-grown seedlings // Amer. J. Bot.—1970.—57, N 3.—P. 267.

#### CLINOROTATION EFFECT ON THE TRANSFORMATION FROM ETYOPLASTS TO CHLOROPLASTS FOR BARLEY SEEDLINGS

N. I. Adamchuk-Chala

The clinorotation effect on the plastide substructure characteristics of greening barley seedlings of the variety "Zoranyi" is investigated. A comparison analysis of dynamic changes in clinorotated greening seedlings and in control ones showed the following: the volume of plastides decreased, the developing of prolamellar body and shorting of lamellae length under greening during 1 h and 3 h take place. Chloroplasts were formed only in the cells of the control variant on greening for 6 h. Possible mechanisms of the delay of transformation from etyoplasts and etyochloroplasts to chloroplasts are discussed.