

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім.М.Г.ХОЛОДНОГО

на правах рукопису



**АДАМЧУК НАДІЯ ІВАНІВНА**

**Структура мезофілу листка в онтогенезі  
рослин *Arabidopsis thaliana*  
(L.)Heunh при дії зміненої сили тяжіння**

03.00.01. - ботаніка

(05)

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук**

Київ-1996

58



00330700 (D)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі клітинної біології та анатомії рослин Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор Є.Л.Кордюм

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Е.А.Головко, кандидат біологічних наук В.О.Тарасенко

Провідна установа: Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться "12" листопада 1996 р. о "10" години на засіданні спеціалізованої вченої ради К.01.82.01. з присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук у Центральному ботанічному саду ім. М.М.Гришка НАН України за адресою: 252014, м.Київ, вул. Тімірязєвська, N1.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Центрального ботанічного саду ім. М.М.Гришка НАН України

Автореферат розіслано "\_\_\_" вересня 1996 року.

Вчений секретар спеціалізованої ради  
кандидат біологічних наук

Г.М.Музичук

AB-85.829

## Загальна характеристика роботи

### Актуальність проблеми

Відкриття гравічутливості клітин на початку 80-х років XX сторіччя дало поштовх різноманітним дослідженням структурно-функціональної організації клітин різного типу при зміні сили тяжіння. Проте структура, ріст і диференціювання клітин мезофілу залишаються мало вивченими, хоча з'ясування реакцій фотосинтезуючих клітин на зміну сили тяжіння є однією з актуальніших проблем в пізнанні життєдіяльності рослин в умовах космічного польоту.

Метою наших досліджень було вивчення структурно-функціональної організації фотосинтетичного апарату *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh на послідовних фазах онтогенезу рослин, та з'ясування закономірностей її змін під дією кліностакування, що частково відтворює біологічні ефекти мікрогравітації.

### Були поставлені завдання:

1. Провести порівняльні дослідження ультраструктурної організації клітин мезофілу листка *A. thaliana* та вмісту пігментів при впливі повільного горизонтального кліностакування та в стаціонарних умовах вирощування.
2. Визначити ряд показників: стан пігмент-білкових комплексів, низькотемпературних спектрів флюоресценції, спектрів збудження флюоресценції гомогенатів листків, індукцію флюоресценції листків за умов дії повільного горизонтального кліностакування та стаціонарного контролю.
3. З'ясувати характер структурно-функціональних перетворень асиміляційного апарату, які виникають в умовах зміненої сили тяжіння, і виступають індикаторами стану його активності.

### Наукова новизна

Вперше отримані дані про детальну ультраструктурну будову фотосинтетичного апарату *A.thaliana* на послідовних етапах розвитку рослин, розвитку клітин від меристематичних до диференційованих зрілих клітин та клітин в процесі старіння.

Складено ультраструктурний паспорт фотосинтетичного апарату *A.thaliana*.

Встановлено, що на відміну від контролю, в хлоропластах кліностакованих рослин зменшується кількість тилакоїдів в гранах при варіюванні довжини поперечника гран,

ЛНБ ім. В. Стефаника  
ЛН Ужгород

зростала ширина інтратилакоїдного простору, збільшувався об'єм тилакоїдів строми. З'ясовано, що в умовах клінонестатування відбувається прискорення старіння *A. thaliana*, що виявлялося в скороченні терміну головних фаз розвитку рослин, посиленні вакуолізації клітин мезофілу, зниженні вмісту хлорофілів, накопиченні каротиноїдів і пластоглобул, зниженні активності фотосистеми 2.

#### **Основні положення, які виносяться на захист**

1. Характер рослинної реакції за умов гіпогравітації залежить від фази розвитку.
2. Такі елементи фотосинтетичного апарату як параметри листкової пластинки, товщина шару мезофілу, об'єм клітин мезофілу є анатомо-морфологічними ознаками, що не змінюються в умовах клінонестатування. На ультраструктурному рівні дія зазначеного чинника позначається на зміні розмірів клітин мезофілу і хлоропластів, розвитку в них системи фотосинтетичних мембран, варіюванні вмісту крохмалю і накопиченні пластоглобул.
3. Серед функціональних ознак фотосинтетичного апарату рослин, які тривалий час перебували в умовах клінонестатування, виявлено зменшення вмісту хлорофілів і збільшення каротиноїдів в листках *Arabidopsis thaliana* L. (Heun), зміну складу пігмент-білкових комплексів і взаємодії між ними, в результаті чого швидкість фотохімічних реакцій зменшується.

#### **Апробація роботи**

*Робота була представлена:*

1. на V молодіжній конференції ботаників в Санкт-Петербурзі (23-28 травня 1994 року, Санкт-Петербург, Російська Федерація),
2. на II Міжнародній конференції "Біокалоїд 95" (20-22 червня 1995 року, Київ),
3. на 14му міжнародному симпозиумі "Plant roots - from cells to systems" (13-15 вересня 1995 року, Брістоль, Великобританія),
4. на 31-st Scientific Assembly of COSPAR, (14-21 липня, 1996, Бермінгем, Великобританія).

*За матеріалами дисертації опубліковані роботи:*

1. Адамчук Н.И. Ультраструктурные изменения мезофилла листа *Arabidopsis thaliana* в условиях клиностаტიрования. Труды пятой молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге. / Ботан. ин-т РАН, 24-26 мая 1994 г. - Санкт-Петербург, 1995. - с. 92-94.
2. Адамчук Н.И. Будова сім'ядольного листка *A. thaliana* cv *Colombia* в умовах кліностакування.// УБЖ,- 1995, т. 52, N 5, с. 605-610.
3. Adamchuk N.I. Responses of the plant photosynthetic apparatus to clinorotation./ Abstracts.14th Long Ashton International Symposium, 13-15 September 1995, p. 43.
4. Адамчук Н.И. Структурно-функціональні зміни хлоропластів *Arabidopsis thaliana* L.(Heyn) cv *Colombia*.//Фізіологія та біохімія культурних рослин,- 1996, т.28, N 5-6, с. 113-117.
5. Adamchuk N.I. The Influence of Clinorotation on the Ultrastructural and Functional Changes of Photosynthetic Apparatus of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh./ Abstracts. 31-st Scientific Assembly of COSPAR, 14-21 July, 1996, Birmingham, p. 312.

### **Загальна характеристика роботи**

#### **Структура та обсяг роботи**

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису об'єкту та методів дослідження, результатів та їх співставлення, висновків та списку літератури (227 літературних джерел, 114 з них друковані англійською мовою). Результати досліджень наведені в 15-ти таблицях. Ілюстративний матеріал складають 14 фотознімків і 14 рисунків.

#### *Об'єкт та методи досліджень.*

Об'єктом дослідження був фотосинтетичний апарат рослини-ефемеру з родини Brassicaceae - *A. thaliana* (L.) Heynh cv *Colombia*, що є об'єктом, який широко використовується в різнобічних біологічних дослідженнях, космічній біології зокрема. Рослини розвивалися в лабораторних умовах при цілодобовому освітленні, інтенсивність освітлення 8 тис. люкс та температурі 22-25°C. Рослини *A.thaliana* вирощувалися з насінин, стерилізованих сумішшю пергідроллю і абсолютного спирту (1:1), у високих цукрових стаканчиках діаметром 3 см і заввишки 17 см на агаризованому поживному

середовищі Ленгріджа-Квітко (Іванов, 1974). Рослини зростали на повільному горизонтальному кліностації з швидкістю обертання 2 оберти на хвилину і у синхронному вертикальному стаціонарному контролі і досліджувалися на головних фазах онтогенезу: сім'ядольних листків - 7 діб, формування розетки -14 діб, початок цвітіння - 21 доба, кінець цвітіння початок плодоношення - 28 діб.

Загальна морфометрія. Для морфометричних обрахунків розвитку рослин проводилися вимірювання по 100 для кожного показника: кількість проростків і розвинених рослин, висота рослин, кількість листків розетки, кількість листків стебла, довжина, ширина і площа листкової пластинки молодих листків розетки. Показники площі визначалися за обрисами листків на міліметровому папері.

Світлова і електронна трансмісійна мікроскопія. Для дослідження особливостей морфолого-анатомічної організації листків і ультраструктурної організації субепідермальних клітин палисадної паренхіми проводили фіксацію висічок центральної частини листкової пластинки молодих розеткових листків завширшки в 1 мм у за стандартною методикою.

Повторюваність дослідів трикратна для кожного варіанту. Напівтонкі препарати для світломікроскопічних досліджень виготовлялися за допомогою ультрамікротому типу LKB, фарбувалися метиленовою синькою і розглядалися в світловий мікроскоп NU-2. Ультратонкі зрізи, отримані теж за допомогою ультрамікротому серії LKB, знімалися на бленди і сіточки на формварову підложку, контрастувалися цитратом свинцю за Рейнольдом і вивчалися в трансмісійному електронному мікроскопі JEM 1200-EX. Розглянуті в світловий мікроскоп препарати поперечних зрізів листкової пластинки молодих розеткових листків були зняті на фотоплівку типу 'Мікрат' на однаковому збільшенні. Обрахунки висоти зрізів і ширини шару мезофілу виконувалися на мікроскопі. Для вимірювання кількості клітин і хлоропластів на одиницю площі зрізу, об'єму клітин і хлоропластів виготовлялися фотографії 18x24 см. Об'єми вищезазначених структур вираховували за формулою для еліпсоїду обертання.

Аналізувалися хлоропласти фізіологічно активних клітин субепідермального шару палисадної паренхіми за методикою, описаною в роботі Сіласвої А.М. (1979).

Для з'ясування функціональних особливостей фотосинтетичного апарату

об'єкту на різних фазах його вегетації вимірювали вміст пігментів в листках *A. thaliana* на спектрофотометрі SPECORD 40-M. Ацетонові витяжки отримували після розтерання наважок листків в ступці і фільтрування суміші через фільтр N3 за методикою, описаною в практикумі ( під ред. Полякова, 1978).

Морфометричні дані підлягали статистичній обробці на ЕОМ ПК IBM PC/AT за стандартною програмою STAT. Для показників з великим варіюванням значень складалися і аналізувалися гістограми.

Спектрометрія. Вимір пігмент-білкових комплексів (ПБК) і флуоресцентних характеристик гомогенатів листків рослин *A. thaliana* проводили на базі відділу біохімії фотосинтезу інституту фізіології рослин і генетики НАНУ з використанням розроблених у відділі спектрофлуориметричних пристроїв.

### **Загальний розвиток і структурно-функціональна організація фотосинтетичного апарату *A.thaliana* в контролі**

З висіяних семи насінин об'єкту у кожному з цукрових стаканчиків розвивалося 3-7 рослин. 80-87% рослин проходили усі фази онтогенезу і утворювали нову генерацію насіння

Оскільки на сьому добу досліду листки розетки рослини не досягають половини своєї генетичнодетермінованої величини, диференційовані клітини мезофілу для цієї фази розвитку рослини не зустрічалися на зрізах. Особливості організації спеціалізованих мезофільних клітин листків *A. thaliana* вивчалися протягом наступних фаз онтогенезу рослини. На 28 добу експерименту рослини *A. thaliana* досягали фази кінця цвітіння, початку плодоношення. Висота рослин коливалася в межах від 11 до 17 см. Асиміляційний апарат об'єкту складався з 5-9 ланцетовидних листків розетки, сформованих на 14 добу досліду і 3-5 сидячих листків стебла - на 21 добу. Верхівка стебла розвивалася в одну або декілька гіллястих китиць з квітками та плодами у вигляді невеликих стручків. Площа молодих листків розетки 15-20 мкм<sup>2</sup>. Вони набували ланцетовидної форми, але з розширеним дистальним кінцем, який закінчувався невеликими зубцями.

На поперечних зрізах листової пластинки 7-8 листків розетки заввишки 63.7±5,4 мкм також розрізняються шари верхнього і нижнього епідермісу, які мали неправильну

подовжену форму і подекуди продихи між ними. Між епідермальними шарами розташовувався шар різноманітної форми і переважно кулястих подовжених клітин мезофілу завширшки  $44,7 \pm 4,3$  мкм. Завдяки розвиненим міжклітинникам паренхіма вони теж не диференціюється чітко на палісадну і губчасту складову. За клітини субепідермального шару палісади приймався шар щільнорозміщених клітин мезофілу, прилягаючий до епідермальних клітин, що мала більші розміри. На  $10^4$  мкм<sup>2</sup> площі припадало 20-40 клітин мезофілу.

Спеціалізовані мезофільні мали характерну для цього типу клітин ультраструктурну організацію. Вони були заповнені великою центральною вакуоллю з таніновими включеннями, яка відтіснила у дистальну частину клітини ядро і цитоплазматичні органели.

Аналіз ультрамікроскопічних зображень медіальних зрізів палісадних хлоропластів виявив наступні особливості організації цих структур: переважно вони мали переважно несиметричну еліпсоїдну форму і досягали об'єму  $40-48$  мкм<sup>3</sup>. Насичена рибосомами строма фотосинтезуючих органел була обмежена цілісною двомембранною оболонкою і містила систему фотосинтетичних мембран, зерна крохмалю і пластоглобули. Між фотосинтезуючими мембранами хлоропластів диференційованих функціонально активних клітин мезофілу розташовувалися по 5-7 зерен крохмалю на зріз і пластоглобули, кількість яких зростала від 7-10 на 14 добу експерименту до 9-12 на 28 добу. За середньостатистичними показниками довжини поперечника гран вірогідної різниці не виявлено ( $0,42 \pm 0,02$  мкм,  $0,48 \pm 0,01$  мкм,  $0,46 \pm 0,02$  мкм відповідно до строку вимірювання). Проте за довжиною поперечника гран спостерігалось значне варіювання (табл. 1). На зрізах контрольних хлоропластів переважали грани з довжиною поперечника  $0,4-0,6$  мкм. Але, якщо на 14 і 21 добу дослідження зустрічалися грани з поперечником до  $0,4$  мкм, то на 28 добу - вони майже не виявлялися, проте збільшувалася кількість довгих гран. Товщина тилакоїдів гран виявилася сталою ознакою ультраструктурної організації хлоропластів. Її значення коливалося в межах  $0,56 \pm 0,06$  нм. Ширина інтратилакоїдного простору також вірогідно не змінювалася (табл. 1). Результати обрахувань фотосинтетичної поверхні асиміляційних мембран хлоропластів доводить переважання площі тилакоїдів строми над площею поверхні тилакоїдів гран, а максимальні розміри

загальної поверхні фотосинтетичних мембран визначені для хлоропластів на 21 добу експерименту і наведені в табл. 1. Онтогенетичні особливості розвитку фотосинтетичного апарату *A. thaliana* на різних рівнях його організації відповідають динаміці вмісту головних пігментів в листках досліджуваних рослин у перерахунку на одиницю маси сухої речовини (табл. 2). Вміст хлорофілу а поступово збільшується від 7 до 21 доби дослідження, коли фіксується його максимальна кількість, що припадає на період цвітіння цієї рослини. Показники вмісту хлорофілу б теж збільшуються під час цих фаз розвитку об'єкту, але їх значення в 2-5 разів виявляються меншими за хлорофіл а. А результати співвідношення вмісту цих пігментів сильно відрізняються лише на 14 добу експерименту. Про накопичення каротиноїдів свідчило збільшення цього пігменту в листках на час початку плодоношення рослин *A. thaliana*. Майже подібне значення цього показника було характерним для сім'ядольних листків.

ПБК реакційних центрів (РЦ) фотосистеми 1 (ФС1) майже не виявлялися на 14 добу експерименту, максимальні їх характеристики припадали на 21 добу, на 28 день дослідження вони знижувалися. Світозбиральний комплекс (СЗК) фотосистеми 2 (ФС2) в олігомерній формі визначається невеликими піками, а ПБК РЦ ФС2 майже не проявляють своєї присутності. ПБК СЗК ФС2 у мономерній формі максимально відмічається у період рослинного цвітіння, для 14 і 28 доби експерименту характерні нижчі його значення. Проте для цих строків розвитку рослин властива висока присутність вільного хлорофілу, що різко знижується на час рослинного плодоношення.

Спектри низькотемпературної флюоресценції (рис. 1) і спектри збудження флюоресценції (рис. 2) в ФС1 контрольних варіантів мають виражені довгохвильові і короткохвильові максимуми, що протягом двох тижнів постійну величину і зменшуються на 28 добу експерименту. Величина співвідношення цих спектрів максимальна під кінець генеративного періоду розвитку рослин 1.02 у порівнянні з 0.95-0.96, що було характерним для попередніх фаз розвитку. Аналіз показників індукції флюоресценції листків контрольних рослин виявив, що співвідношення  $Q_b$  невідновлюючих РЦ ФС2 до загальної кількості РЦ ФС2 збільшується у контрольних зразках від 0.16 до 0.26-0.27. Фотохімічна ефективність в ФС2 зростає на 21 добу і різко зменшується на 28 добу, а

Таблиця 1

**Ультроструктурний паспорт хлоропластів  
субепідермальних клітин палисади верхніх  
розеточних листків *A. thaliana***

Показники	14 діб	21 доба	28 діб
<b>Парціальні об'єми, %:</b>			
тилакоїди гран	9.15±0.26	17.60±0.63	11.90±0.49
тилакоїди строми	16.55±0.73	19.95±0.48	18.15±0.55
строма	32.60±1.53	27.40±1.21	39.20±1.25
зерна крохмалю	40.45±1.51	24.75±0.36	29.00±0.60
пластоглобули	0.20±0.08	0.90±0.23	1.10±0.16
<b>Абсолютні об'єми, мкм<sup>3</sup>:</b>			
хлоропласт	45.68±3.44	40.88±0.96	46.41±1.56
тилакоїди гран	5.21±0.32	7.72±4.57	5.22±0.40
тилакоїди строми	8.96±0.49	7.50±0.50	9.24±0.49
строма	27.80±0.42	13.50±0.52	17.16±1.50
зерна крохмалю	23.69±1.78	11.50±0.61	11.91±2.76
пластоглобули	0.10±0.04	0.75±0.11	0.81±0.11
<b>Кількість елементів на зрізі хлоропласту:</b>			
зерен крохмалю	4.50±0.45	5.05±0.46	4.30±0.44
пастоглобул	8.20±0.54	7.25±0.34	6.65±0.40
<b>Кількість тилакоїдів в грані</b>	7.40±0.98	5.79±0.21	6.64±0.26
Довжина поперечника гран, мкм	0.46±0.02	0.48±0.01	0.42±0.02
Товщина тилакоїда гран, нм	5.60±0.28	5.50±0.36	5.41±5.82
Товщина інтратилакоїдного простору, нм	1.40±2.00	10.91±0.93	10.70±1.18
<b>Фотоактивна поверхня фотосинтетичних мембран, мкм<sup>2</sup>:</b>			
тилакоїдів гран	270±11	378±17	257±10
тилакоїдів строми	306±14	331±17	305±10
загальна	526±22	709±27	562±14

**Вміст пігментів в листках *A. thaliana*, мг/г одиниці маси сухої речовини**

Термін вирощування	Пігменти			
	хлорофіл а	хлорофіл б	хлорофіли а+б	каротиноїди
<b>7 діб:</b>				
контроль	0.13±0.05	0.08±0.01	0.21±0.09	0.04±0.01
кліностатування	0.22±0.04	0.09±0.00	0.32±0.06	0.04±0.00
<b>14 діб:</b>				
контроль	0.37±0.08	0.07±0.01	0.43±0.05	0.02±0.01
кліностатування	0.37±0.01	0.08±0.01	0.44±0.08	0.02±0.01
<b>21 доба:</b>				
контроль	0.69±0.04	0.39±0.01	1.08±0.08	0.02±0.03
кліностатування	0.55±0.19	0.13±0.01	0.67±0.09	0.05±0.01
<b>28 діб:</b>				
контроль	0.61±0.03	0.31±0.01	0.92±0.04	0.04±0.01
кліностатування	0.43±0.07	0.13±0.01	0.54±0.05	0.09±0.01

інтенсивність темнових процесів темнових процесів фотосинтезу характеризується постійними значеннями 2.01-2.24.

### **Співставлення експериментальних і літературних даних**

На 28 добу дослідження рослини контрольних і кліностатованих варіантів знаходилися в фазі кінця цвітіння, початку плодоношення. Цієї фази розвитку досягало 80 % рослин у контролі і 73% рослин при тривалому горизонтальному кліностатуванні. Головним чином зменшення кількості рослин, що росли в умовах зміненої сили тяжіння було пов'язане з тим, що гіпокотилі деяких проростків ще сьомої доби експерименту або стелилися по поверхні поживного середовища, або росли в агар. Таким чином, проростки припиняли свій ріст і гинули.

Отже, повільне горизонтальне кліностатування не мало летального впливу на розвиток об'єкту. Його дія позначилася на відсутності чіткої орієнтації росту рослин в гравітаційному полі Землі, що можливо є результатом порушення енергетичного обміну в клітинах при дії зміненої сили тяжіння (Лауринавичюс и др., 1984, Заботина, 1987, Таирбеков и др., 1988), а саме, зміни вмісту полісахаридів в клітинній оболонці і мінеральних елементів біомаси рослин. Також нами стверджується, що із метаболітичними змінами об'єкту при кліностатуванні пов'язане прискорення розвитку рослин. Так у рослин експериментальних варіантів формування листової розетки, цвітіння і плодоношення на 2-3 дні випереджало контрольні. Про прискорення старіння досліджуваних рослин під дією стресу зміненої сили тяжіння свідчить скоріше за контрольне жовкнення листків розетки і етиоловання сім'ядольних листків.

Взагалі, показники онтогенетичного розвитку *A. thaliana* як в контролі, так і в експериментальних умовах були подібними до значень, наведених в роботах (Кондратьєва-Мельвиль, 1980, Кондратьєва-Мельвиль, Водолазский, 1982, Петров, Визир, 1982, Меркис, Лауринавичюс, 1983, Усманова, 1989). На сьому добу дослідження формувалося два фотосинтезуючих закруглених сім'ядольних листка на невеликому гіпокотилі. Так як і при експонації сім'ядольних проростків *A. thaliana* на борту орбітальної станції "Салют-7" (Меркис, Лауринавичюс, 1983), в наших дослідженнях не виявлено вірогідну різницю розмірів сім'ядольних листків. Відсутність змін анатомо-морфологічних і ультраструктурних показників розвитку сім'ядоль скоріш за все пов'язані

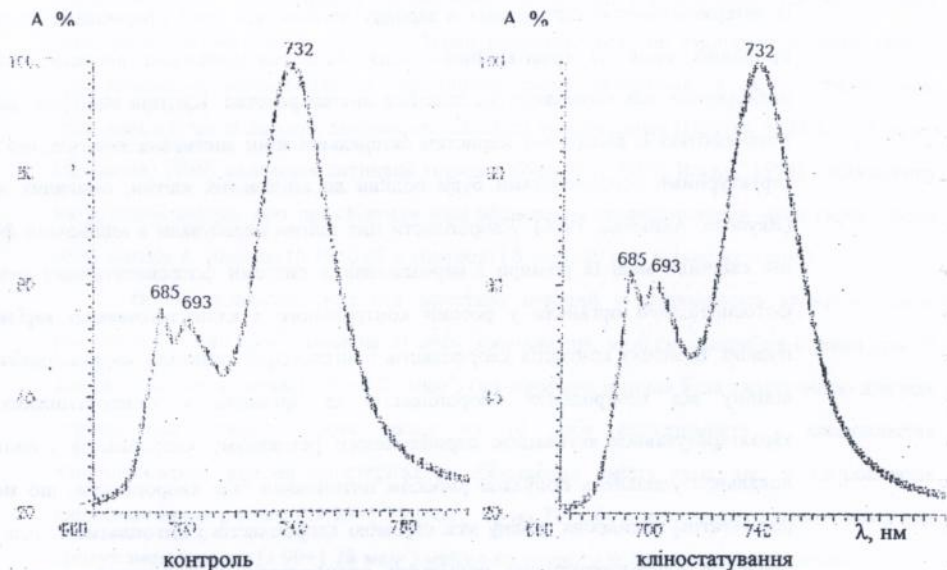


Рис. 1 Низькотемпературні спектри флюоресценції гомогенатів листків *A. thaliana* на 28 добу

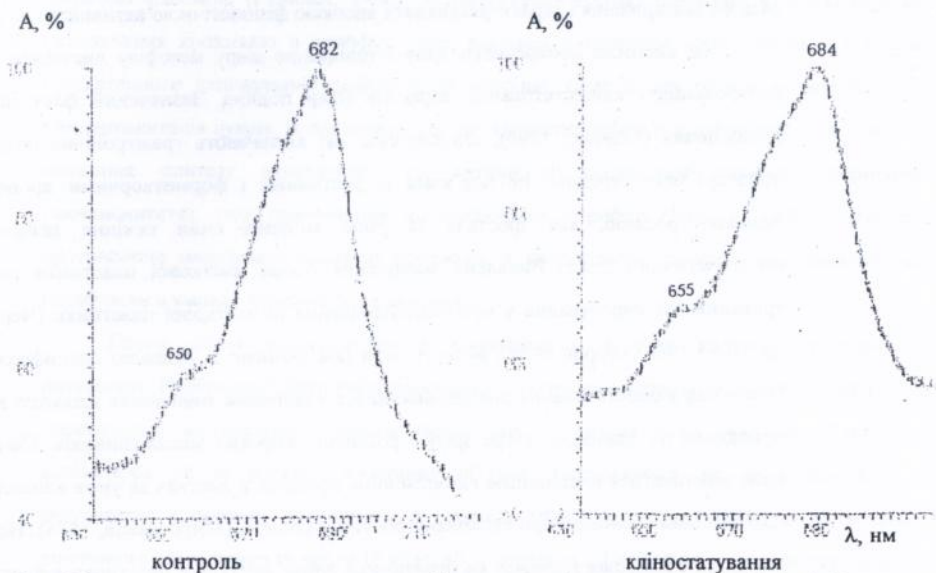


Рис. 2 Спектри збудження довгохвильової флюоресценції гомогенатів листків *A. thaliana* на 28 добу

із детермінованістю цих органів в зародку насіння, що було сформоване на рослині за природних умов дії гравітаційного поля. Між сім'ядольними листками на 7 добу дослідження теж починають закладатися листки розетки. Клітини мезофілу цих листків розвиваються із апікальних меристем латеральної зони листкових зачатків, що за своїми структурними особливостями були подібні до апікальних клітин, описаних в роботах (Якубова, Акімова, 1976). Хлоропласти цих клітин перебували в ювінільній формі, про що свідчили малі їх розміри і нерозвиненість системи фотосинтетичних мембран. Ці фотосинтезуючі органели у рослин контрольного і кліностатованого варіантів були подібні. В місцях контактів хлоропластів і мітохондрій виникали м'яліноподібні тіла. На відміну від контрольних хлоропластів ці органели у кліностатованих рослин характеризувалися активацією периферійного ретикулуму хлоропластів і виникненням локальних ущільнень популяції рибосом цитоплазми біля хлоропластів, що можливо є результатом посилення обміну між строною хлоропластів і цитоплазмою. Але ретельне вивчення ультраструктурної організації хлоропластів проводилися на хлоропластах диференційованих клітин мезофілу верхніх листків розетки, що були вже сформовані на 14 добу дослідження і характеризувалися високою фізіологічною активністю на 28 добу.

За висотою поперечного зрізу і товщиною шару мезофілу листкової пластинки контрольних і кліностатованих варіантів були подібні. Зазначений факт підтверджує припущення (Меркис, 1990), що системи, які визначають гравітропічне подразнення і індукцію безпосередньо не пов'язані із ростовими і формотворчими процесами, що дозволяє рослині, яка зростала за умов зміненої сили тяжіння завершити свій онтогенетичний цикл. Виявлене зменшення площі листкової пластинки рослин, що тривалий час перебували у космосі, потоншення їх листкової пластинки (Червченко и др., 1985, 1986) скоріш за все можуть бути пов'язаними із видовою специфікою рослин. Проте для кліностатованих рослин виявилось властивим зменшення кількості клітин, що припадали на одиницю площі зрізу і розвиток широких міжклітинників. По-перше, це мало викликати посилення газообмінних процесів в листках за умов кліностатування. Схожий ефект виникав при експонації рослин у космосі (Мирославов, 1974). Незважаючи на те, що в клітинах мезофілу на поперечних зрізах листкової пластинки кліностатованих рослин збільшувалася кількість хлоропластів у клітинах, кількість цих органел на

одиночку площі зрізу була у експериментальних зразків меншою. Цьому сприяло збільшення об'єму клітин мезофілу. Нами припускається, що виникнення цього ефекту при тривалому кліноостатуванні спричинено двома процесами, а саме: потоншенням оболонки клітин за рахунок зменшення кількості полісахаридів (Недуха, 1988 а, б, Попова, Шнюкова, 1989) внаслідок активації гідролаз (Nedukha, 1994, Brawn, 1994) і збільшення вакуолізації клітин, про що свідчили дані збільшення співвідношення маси сирої і сухої ваги листків *A. thaliana* ( $6.16 \pm 0.09$  у контролі і  $8.14 \pm 0.19$  при кліноостатуванні).

Об'єм тилакоїдів гран був вірогідно менший у хлоропластів кліноостатованих рослин ( $4.57 \pm 0.49$  мкм<sup>3</sup>) лише на 21 добу дослідження, а об'єм тилакоїдів строми при дії кліноостатування зростав ( $10.37 \pm 0.21$  мкм<sup>3</sup>) і ця вірогідна різниця була характерною для усіх строків вимірювання. Проте, якщо на 14 добу експерименту в хлоропластах кліноостатованих рослин спостерігалось збільшення вмісту крохмалю у хлоропластів кліноостатованих рослин ( $29.95 \pm 1.70$  мкм<sup>3</sup>), то на 28 добу в дослідному варіанті вміст цих сполук зменшувався ( $3.99 \pm 1.28$  мкм<sup>3</sup>) майже до повного їх зникнення в органелах.

За своїми анатомо-морфологічними особливостями *A. thaliana* належить до видів із закритою флоемою (Гамалей, 1990), де блокування відтоку асимілянтів призводить до накопичення крохмалю в мезофілі. Але, оскільки включення хлоропластів в процеси регуляторного депонування здійснюється скоріше, саме в цих органелах відбувається компартментація цукрів. А посилення під час кліноостатування гідролітичних процесів, або зниження синтезу моноцукрів, та активності крохмальсинтезуючих ферментів глюкоксинтез, таке припущення висловлюється в роботі (Недуха, 1986), сприяють прогресуюче зменшення кількості крохмалю в хлоропластах рослин, які тривалий час перебували в умовах зміненої сили тяжіння.

Проте об'єм пластоглобул в хлоропластах зростав протягом рослинного онтогенезу. Найбільший його вміст фіксувався в експериментальному варіанті на 28 добу і перевищував контрольне значення більш ніж у півтора рази. Але це збільшення відбувалося не за рахунок зростання об'ємів пластоглобул, як це зазначалося в результатах космічних досліджень *A. thaliana* (Жордум и др., 1989), а за рахунок вірогідного збільшення їх числа ( $6.65 \pm 0.40$  у контролі і  $10.65 \pm 0.66$  при кліноостатуванні). Нами припускається, що набуття хлоропластами зігнутої або S-подібної форми пов'язане

із зміною осмотичної ситуації в клітині, проліферацією клітинної оболонки. Хлоропласти подібних форм описані в роботах (Абилов и др., 1985, 1986, Алиев и др., 1985). Вони були виявлені в клітинах палисади листків *Epidendrum gadicans*, орхідеї, що тривалий період перебувала в умовах космічного польоту. Також нами, як і в зазначеній роботі були виявлені порушення організації внутрішньої мембранної системи, такі як дезінтеграція тилакоїдів. При аналізі параметрів складових системи фотосинтетичних мембран фізіологічно активних хлоропластів нами виявлено, що як у контролі, так і у експериментальних варіантах кількість гран на зріз хлоропласту майже не змінювалася. На 28 добу в усіх варіантах дослідження поступово збільшувалася частка гран, що містила більшу кількість тилакоїдів. Але в хлоропластах кліностатованих рослин, на відміну від контрольних, більшість гран містила 3-5 тилакоїдів. Вірогідної різниці між середньостатистичними показниками кількості тилакоїдів в грані не виявлено, але вона була характерною для значень довжини поперечника гран. Зменшення величини цього показника в хлоропластах кліностатованих рослин склало майже 20%. Проте при аналізі співвідношень гран за довжиною поперечника на зрізі на 28 добу експерименту у кліностатованого варіанту виявляється збільшення кількості гран, що мають меншу (0.4-0.5 мкм) або більшу (поверх 0.6 мкм) довжину поперечника.

З'ясовано, що товщина тилакоїдів гран хлоропластів фізіологічно активних клітин є досить сталою величиною і дорівнює 5 нм, а вісь товщинау інтратилакоїдного простору збільшувалася у хлоропластів кліностатованих рослин. Вірогідна різниця виявлялася на 28 добу дослідження ( $15.22 \pm 0.98$  нм). Можливо, ця ознака є наслідком розконтактування мембран тилакоїдів гран, що суттєво впливає на функціонування фотосистем. В дослідженнях (Недуха и др., 1991) в хлоропластах мезофільних клітин пшениці після 16 добової експонації рослин у космосі кількість тилакоїдів в гранах мала тенденцію до збільшення, що при ширині гран в 0.35 мкм вказувало, за припущенням авторів, на зменшення інтратилакоїдного простору в умовах мікрогравітації. Також дослідниками визначено зменшення тилакоїдів гран на зрізі хлоропластів при перебуванні рослин у космосі, але цей показник, як і об'єм крохмалю, має широке варіювання і добову залежність (Силаева, 1982).

За умов тривалого кліностакування відбуваються значні зміни величини поверхні фотосинтетичних мембран досліджуваних хлоропластів. Головним чином вірогідна різниця між експериментальними і контрольними показниками виявлялася на 28 добу. Для тилакоїдів гран властивим було зменшення їх фотоактивної поверхні мембран ( $189+8$  мкм<sup>2</sup>), для тилакоїдів строми - збільшення ( $457+23$  мкм<sup>2</sup>), тому різниця між значеннями загальної фотоактивної поверхні фотосинтетичних мембран контрольних і кліностакованих варіантів в цей строк вимірювання не була статистично вірогідною. Максимальні величини зазначеного показника спостерігалися на 21 добу дослідження, що відповідає фазі цвітіння рослин. Також ці дані узгоджуються з результатами вимірювання вмісту головних пігментів листків *A. thaliana* в перерахунку на одиницю маси сухої речовини листків (табл. 2). Слід зауважити, що лабораторні рослини *A. thaliana* відрізняються від рослин дикого типу зменшенням вмісту хлорофілів (Усманова и др., 1989).

Із зниженням вмісту пігментів фотосинтезу в 1.5-2 рази при кліноставанні корелює збільшення кількості каротиноїдів, що протягом рослинного розвитку накопичуються в листках. При завершенні генеративного періоду жовтих пігментів контрольних рослин містилося в 2.5-3 рази менше ніж кліностакованих. Результати наших досліджень відповідають даним космічних експериментів. Зниження вмісту хлорофілів в умовах мікрогравітації спостерігалось у рослин гороху (Лауринавичюс и др., 1984, Румянцева и др., 1989). Автори Лауринавичюс и др. (1984) пов'язують цей ефект із можливою затримкою синтезу цих пігментів під час космічного польоту, або посиленням їх руйнування, що вбачається нами більш вірогідною. Збільшення вмісту каротиноїдів при експонації рослин у космосі автори пояснюють здатністю цих пігментів виконувати функцію терморегулювання, накопичуючи надлишкову енергію квантів, тобто виконувати таким чином роль теплового фільтру. Ми ж вважаємо цей ефект ознакою швидшого старіння рослин в умовах кліностакування. Отже, отримані дані можуть розглядатися як доказ порушення функціонування внутрішніх регуляторних механізмів при зміні сили тяжіння, фотосинтетичного апарату зокрема.

Денситограми електрофоретичного розподілу хлоропластів для 14, 21, 28 добових рослин мають типовий для цих кривих вигляд і складаються із декількох смуг, що відповідають ряду пігмент-білкових мембранних комплексів. Головним чином, різниця

між контрольними і експериментальними варіантами полягає в зменшенні олігомерної форми ПБК СЗК і збільшенні вільного хлорофілу. Окрім того, для 14 добових рослин відносна інтенсивність смуги 685 нм була вищою у порівнянні з смугою 693 нм. У рослин на 28 добу співвідношення інтенсивностей вказаних смуг (685-693 нм) стає однаковим з контрольними значеннями. Хоча сумарна їх інтенсивність, як і раніше, зберігається більш високою для кліноостатованих варіантів. Ці дані можуть означати, що ефективність захоплення енергії в реакційних центрах ФС2 знижена для кліноостатованих рослин. Окрім того, погіршено перенесення електронів між різними формами хлорофілу в ФС2, особливо для проростків рослин. В спектрах збудження довгохвильової флюоресценції ФС1 (рис. 2) спостерігається слабка відмінність між варіантами на 14 добу. Головним чином вона полягала в невеликому короткохвильовому зсуві головної смуги спектру для кліноостатованих рослин. Протягом кліноостатування ця відмінність зростає. А саме, збільшується короткохвильовий зсув максимуму і змінюється співвідношення амплітуди при 650 і 680 нм в спектрах як контрольних, так і дослідних варіантів. Остання величина змінюється не монотонно: максимальна різниця характерна для 21 добових рослин і зменшується для 28 добових. Також зміни стосуються форми спектрів.

Отже, виходячи із цих спостережень можна прийти до висновку, що для ФС2 кліноостатованих рослин спостерігаються зміни в обміні енергією між різними формами хлорофілу, а також зменшення ефективності переносу на антенні форми реакційних центрів. Також при кліноостатуванні знижується активність світозбиральних комплексів ФС2, що перебували в олігомерній формі. Знижувалась активність фотохімії в ФС2. Особливо цей ефект проявлявся на 28 добу кліноостатування. Ефективність процесів темної фази під впливом фізичного чинника теж знижувалася.

Відомо, що живі організми, рослинні зокрема, здатні реагувати на будь-які зміни умов оточуючого середовища в досить широких межах і можуть набувати незворотніх змін при екстремальному впливі або при тривалій дії фактору. Отже, повільне горизонтальне кліноостатування не є екстремальним чинником для розвитку інтактних рослин, адже вони проходять головні фази онтогенезу і формують нову генерацію насіння.

Спіраючись на характеристики зон рослинного реагування під дією будь-яких зовнішніх подразників (Силаєва и др., 1978) визначасмо наступні зони рослинного реагування на дію кліноостатування, зважаючи на короткий у порівнянні з терміном онтогенетичного періоду інших рослин розвиток *A. thaliana*. Протягом семи діб росту спостерігається посилення розвитку рослин за експериментальних умов. Протягом наступних семи днів показники розвитку фотосинтетичного апарату досліджуваних рослин майже однакові. Лише у кліноостатованих рослин спостерігається прискорення процесу формування розетки листків. На 21 добу експерименту рослини цвітуть, а на 28 добу експерименту рослини формують плоди і набувають незворотніх змін.

### **Висновки:**

1. На основі вперше проведеного комплексного дослідження, вивчено будову і функціональний стан фотосинтетичного апарату *A. thaliana* в онтогенезі рослин в нормі і при дії кліноостатування.

2. Виявлено вікові зміни ультраструктурних елементів фотосинтетичного апарату *A. thaliana*, які проявлялися у збільшенні площі і об'єму фотосинтетичних мембран на 21 добу, що відповідає фазі цвітіння рослин, збільшенні кількості тилакоїдів в грані і накопиченні пластоглобул.

3. Встановлено, що на відміну від контролю, в хлоропластах кліноостатованих рослин зменшувалася кількість тилакоїдів в гранах при варіюванні довжини поперечника гран, зростанні ширини інтратилакоїдного простору, збільшувався об'єм тилакоїдів строми. Вірогідна різниця цих показників виявлялася, а на 28-му добу дослідження, коли більшість рослин перебувала в фазі плодоношення. Об'єм зерен крохмалю у хлоропластів кліноостатованих рослин зростав на 14 добу дослідження, на 28 добу - він зменшувався майже до повного зникнення крохмалю.

4. Виявлено, що максимальний вміст хлорофілу був притаманний рослинам на 21-у добу, тобто фази цвітіння. У кліноостатованих рослин він був у 1.5-2 рази менший за контрольний. Кількість каротиноїдів поступово збільшувалася в листках рослини на 28 добу і в 2.5-3 рази перевищувала контрольні показники.

5. Визначено, що функціональний стан пігмент-білкових комплексів кліноостатованих рослин відрізнявся від контрольного, а саме: виникла відмінність набору нативних форм хлорофілу, складу пігмент-білкових комплексів, а також взаємодії між ними, що може спричиняти уповільнення переносу енергії до реакційних центрів і, як наслідок, швидкості фотохімічних реакцій.

6. З'ясовано, що в умовах кліноостатування відбувається прискорення старіння *A. thaliana*, що виявляється в скороченні терміну головних фаз розвитку рослин на 2-3 дні. Структурно-функціональними ознаками цього процесу є визначене нами посилення вакуолізації клітин мезофілу, зниження вмісту хлорофілів, накопичення каротиноїдів і пластоглобул, зниження активності в ФС2.

7. Запропоновано використовувати ультраструктурний паспорт хлоропластів *A. thaliana*, модельної рослини, для експрес-оцінки стану фотосинтетичного апарату як в умовах мікрогравітації та кліноостатування, так і під дією інших екзогенних чинників.

#### **Анотація**

Н.И.Адамчук. Структура мезофилла листа в онтогенезе растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Неупн в условиях измененной силы тяжести.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.01. - ботаника, Центральный ботанический сад им. Н.Н.Гришко НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается диссертация, по материалам которой опубликовано 5 научных работ. При использовании различных методических подходов получены новые данные, касающиеся динамики структурной и функциональной организации ассимиляционного аппарата растений, длительное время растущих при клиноостатировании, которое воспроизводит частичные биологические эффекты микрогравитации. Влияние проявилось в увеличении размеров клеток мезофилла и уменьшении их числа при развитии листа в условиях клиноостатирования. Значительные изменения ультраструктуры хлоропластов фотосинтетических клеток проявились на 21-е сутки экспериментов: уменьшилось количество тилакоидов в гране и увеличилась длина тилакоидов стромы.

Это коррелировало с изменениями в содержании хлорофиллов, количество которых уменьшалось при клинотатировании. Также уменьшался объём крахмала, а пластоглобул - увеличивался. Это соответствовало увеличению содержания каротиноидов, изменениям светособирающих комплексов и транспортной их активности. Полученные результаты обсуждаются в свете современных представлений об адаптации растений к условиям изменённой силы тяжести.

Работа выполнялась при поддержке гранта 349-Б Президиума Национальной академии наук Украины.

### **Brief information**

N.I.Adamchuk Structure of leaf mesophyll in the ontogenes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh under the influence of change gravity condition.

Thesis for a candidate of biological sciences degree, speciality 03.00.01 - botany. N.N.Grishko Central Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1996.

The thesis material of which has been used to publish 5 research works is defended.

Today it is known microgravity affects the root statocytes may cause the actual disturbances in plant assimilative organs. Nevertheless, the dynamics of structural and functional rearrangements of the assimilative plant apparatus through the protracted time under altered stress is unknown. In this way the goal of our experiments was to provide the study of a structural and functional organization of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* under the influence of clinorotation, which reproduces partially the biological effects of microgravity. It was shown an increase of the mesophyll cell size and decrease of its number, during leaf growth under clinorotation. The essential changes of chloroplast ultrastructure in the photosynthetic cells were revealed on the 21st day of experiments. A decrease of a thylakoid number in the both granae and an increase of a length of the thylakoids in a stroma.

It is correlated with the changes in a content of chlorophylls, which has decreased under clinorotation was described also. A starch volume decreased but a number of plastoglobules increased. It is appropriated to an increase of a carotenoids content changes of light-harvesting complexes and the transport activity between them.

At least, clinorotation conditions called the inhibition of the photosynthetic apparatus of *A.thaliana*. Selected results are discussed with the modern views how plant adapt to the influence of altered gravity.

This work was supported by Presidium of National Academy of Sciences of Ukraine grant number 349-Б.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, мікрогравітація, кліноштатування, морфометрія, мікроскопія, листок, мезофіл, хлоропласт, пігменти, ПБК, спектрометрія, індукція флюоресценції.

---

Подписано к печати 11.10.96 г. Формат 60x84.16

Объем: 1.0 усл.-печ.л., 1.0 уч.-изд.л.

Тираж 100. Заказ 52

---

Отдел оперативной 000 "МФА"

277826

**AB 35.829**