

О.М. НЕДУХА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01001, Україна

ФЕНОТИПІЧНІ ЗМІНИ КЛІТИН ЛИСТКІВ *SIUM LATIFOLIUM* L. ПРИ ВОДНОМУ ДЕФІЦИТІ

Ключові слова: листок, ультраструктура, пігменти, водний дефіцит, *Sium latifolium*.

Надземні рослини у природних умовах можуть переживати певний період водного дефіциту, який провокує зниження фіксації CO₂ та обмежує продуктивність [12]. Встановлено, що фотосинтетична здатність і, частково, реакції електронного транспорту у тилакоїдах хлоропластів свідчать про певну стійкість до стресу обезводнення [13]. В разі незначного помірному водного дефіциту структура тилакоїдів хлоропластів не змінюється. Лише у випадку посилення водного стресу можна спостерігати деструктивні зміни в органелах. Зокрема, в лабораторних умовах — розбухання та деструкцію тилакоїдів хлоропластів у клітинах надземних органів [15, 16], зменшення кількості мітохондрій у клітині та зміни їх об'єму [13, 15], зниження рівня вільних цитокінінів та ІОК [10], збільшення вмісту фосфатидилхоліну, кардіоліпину і фосфатидилгліцерину у плазматичній мембрані проростків *Phragmites communis* при зниженій вологості ґрунту [16]. Дані щодо впливу помірного водного дефіциту на ультраструктуру клітин коренів та мезофілу листків гідрофітів фрагментарні [1, 2, 7]. Більшість класичних монографій присвячена вивченню особливостей мезофілу листків культурних рослин, що виникають під дією світла, змін водного режиму, температури та хімічних елементів живлення дефіциту ґрунту [9, 12]. Незважаючи на певні досягнення у вивченні фенотипічних змін гідрофітів, механізми впливу помірного водного дефіциту на ультраструктуру та пігментний аналіз листкових пластинок гідрофіту *Sium latifolium* L. комплексно не досліджували. Тому нашим завданням було вивчення ультраструктури клітин мезофілу та визначення вмісту пігментів у листках *S. latifolium*, який зростав у воді та на суходолі.

Матеріал та методи дослідження

Об'єктом дослідження були листкові пластинки водного еко типу *S. latifolium*, який зростав у воді (на глибині 30—70 см) біля берега р. Псьол (м. Велика Багачка Полтавської обл.) та на суходолі — у лісі, вздовж берега річки, на віддалі до 25 м від берега. Для досліджень листки веху широколистого збирали у фазі цвітіння (червень). Листкові пластинки у польових умовах фіксували для електронної мікроскопії та збирали для біохімічного визначення вмісту пігментів. Для мікроскопії фіксували другі листкові часточки (листоч-

ки) перших надводних листків водної рослини та ідентичні листочки перших листків суходільної. Матеріал фіксували опівдні 2,5 %-м глютаровим альдегідом на 0,5 М какодилатному буфері (рН 7,2), протягом 10—12 годин, потім дофіксували 2 %-м OsO₄ на ідентичному буфері протягом 10—12 годин, обезводнювали етанолом та ацетоном і заливали у суміш епоксидних смол (епон/аралдит) за загальноприйнятою в електронній мікроскопії методикою. Для фіксації матеріал брали з чотирьох листків трьох водних та суходільних рослин веху. Лінійні розміри хлоропластів у досліджуваних листках визначали на 30 клітинах кожного типу мезофілу. Тонкі зрізи клітин вивчали в електронному мікроскопі JEM-1200EX. Одержані дані обробляли статистично за програмою БІО-8.

Для біохімічного визначення вмісту фотосинтезуючих пігментів брали другі часточки (без центральної жилки) із чотирьох листків у чотирьох рослинах водного та суходільного веху. Половину матеріалу залишали для визначення сухої маси, із другої половини виділяли пігменти. Пігменти екстрагували 85 %-м ацетоном у польових умовах, у подальшому їх вміст визначали у лабораторних умовах за методом Гавриленко [1], використовуючи формули Робелена та Ветштейна. Виміри проводили на спектрофотометрі Specord M40.

Результати досліджень та їх обговорення

Мезофіл надводних листків водної форми *S. latifolium*

Виміри вмісту води у ґрунті, на якому зростали рослини водного веху, засвідчили, що ця величина становила 71,82 %. Вивчення ультраструктури клітин мезофілу палісадної та губчастої паренхіми надводних листків показало, що вони мали структуру, характерну для паренхімних клітин (рис. 1, *a—в*). Клітини мезофілу на стадії зрілого листка відзначались наявністю великої центральної вакуолі (рис. 1); органели розміщувались уздовж клітинних оболонок, ширина яких була близько 0,4 мкм. У клітинах палісади хлоропласти лінзоподібної форми (рис. 1, *a*), лінзоподібні та/або округлі — у клітинах губчастого мезофілу (рис. 1, *в, з*). Середня кількість хлоропластів на зріз клітини палісади становила $7,18 \pm 0,21$, губчастого мезофілу — $5,61 \pm 0,35$ (табл. 1). Середній розмір хлоропластів досягав $6,05 \times 2,34$ мкм. Строму хлоропластів займали зерна крохмалю розміром $1,5 \times 0,8$ мкм, площа яких становила 18,5 % від площі хлоропластів (табл. 2). В електроннощільній стромі дуже рідко спостерігалися пластоглобули діаметром до 50 нм. Для хлоропластів характерна велика кількість гран (до 16), число тилакоїдів у яких коливалось від 2 до 20 (табл. 2). Мітохондрії конденсованого типу, округлі чи злегка витягнуті, середній розмір уздовж довгої осі становив 1,0—1,2 мкм, короткої — 0,5 мкм. Більшість мітохондрій контактувала з пероксисомами та хлоропластами. У поодиноких клітинах спостерігалися дрібні електронно щільні утворення, які контактували із цитоплазматичною мембраною і тонопластом.

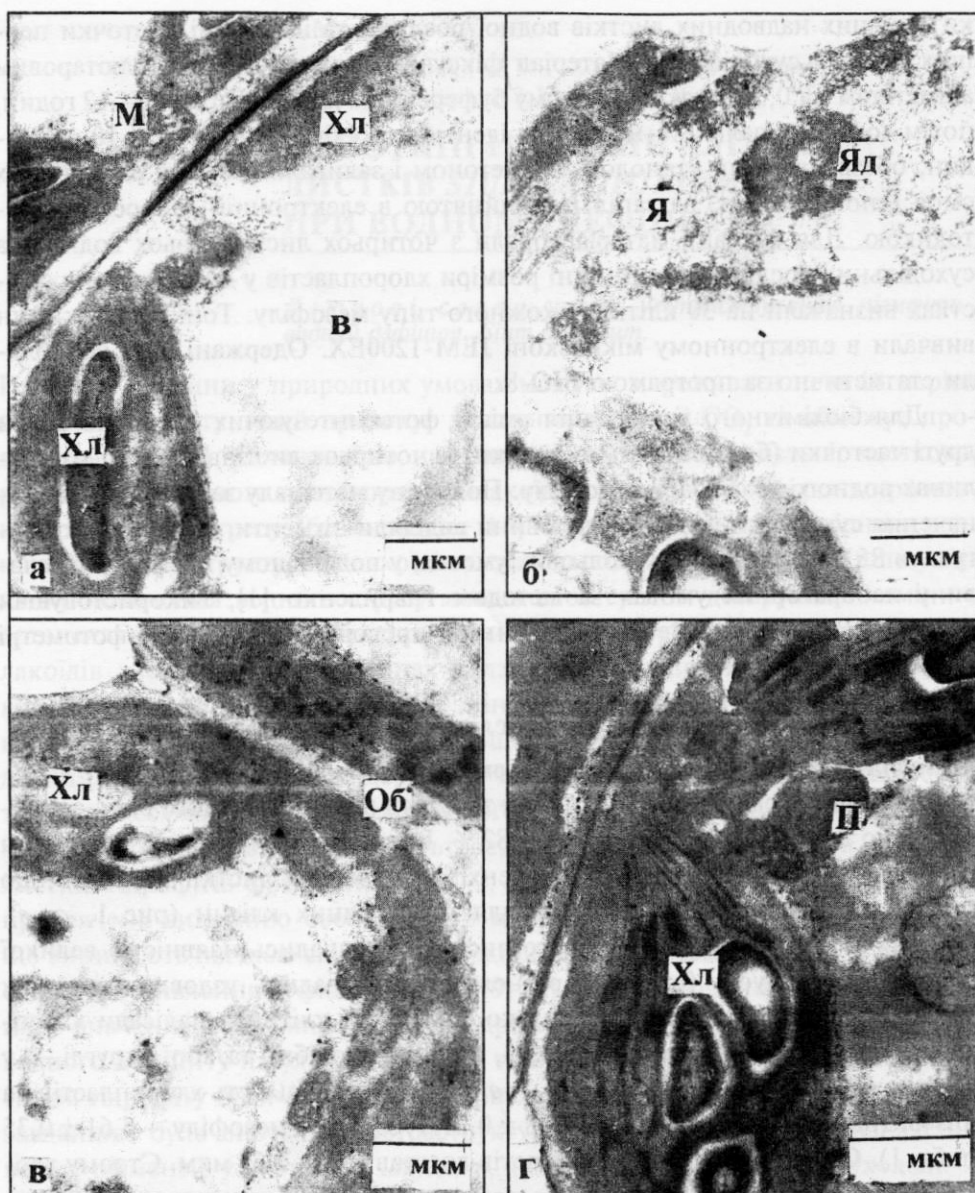


Рис. 1. Фрагменти клітин мезофілу надводних листків *Sium latifolium* L.: В — вакуоль, М — мітохондрія, Хл — хлоропласт, Об — клітинна оболонка, П — пероксисома, Я — ядро, Яд — ядерце
 Fig. 1. The fragments of mesophyll cells of *Sium latifolium* L. above-water leaves: В — vacuole, М — mitochondria, Хл — chloroplast, Об — cell wall, П — peroxysome, Я — nucleus, Яд — nucleolus

Злегка витягнуте ядро мало щільну нуклеоплазму, велике ядерце (1,0–1,5 мкм у діаметрі), на периферії якого міститься багато гранулярних структур. Зовнішня оболонка ядра густо вкрита рибосомами. Ендоплазматичний ретикулум гранулярний, канікулярний, розміщений уздовж оболонок. У цитоплазмі було безліч рибосом та полісом.

Мезофіл листків суходільної форми *S. latifolium*

Виміри вмісту води у ґрунті, на якому зростали рослини суходільного веху, показали, що ця величина становила 33,74 %. Клітини палисадного та губчастого мезофілу, як і відповідні клітини мезофілу водних форм веху, мали велику центральну вакуоль, а органели розміщувались уздовж клітинних оболонок (рисунок 2, 3). За структурними ознаками ми умовно поділили хлоропласти на два типи: з інтактною ультраструктурою і ті, тилакоїди яких були частково зруйновані (рисунок 2, в; 3, а, б). Наявність останніх, очевидно, може бути однією з перших ознак старіння клітин. Відмінності хлоропластів з інтактною структурою порівняно з хлоропластами листків водних рослин веху полягали у збільшенні кількості пластоглобул (від 30 до 37 на зріз) та вмісту тилакоїдів у гранах (таблиці 1, 2; рис. 3, в). Іноді траплялися хлоропласти неправильної форми (рис. 2, з).

Ядро овальне, злегка витягнуте уздовж оболонки, нуклеоплазма щільна, на периферії ядра знаходиться компактний хроматин (рис. 2, в), ядерце діаметром близько 0,8 мкм. Навколо зовнішньої мембрани оболонки ядра кількість рибосом незначна. У цитоплазмі багато рибосом та полісом, як і в клітинах мезофілу надводних листків водного екотипу. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум представлений дуже короткими каналами. Мітохондрії конденсованого типу часто перебували у контакті з хлоропластами

Таблиця 1. Кількісна характеристика хлоропластів та їх тилакоїдів у клітинах мезофілу веху, який зростає у воді та на суходолі

Екотип веху/тип листка	Кількість хлоропластів на зрізі різних клітин мезофілу		Розподіл гран за числом тилакоїдів у хлоропласті, %				
	палисадного	губчастого	2—3	4—6	7—10	10—20	більше 20
Водна рослина/другий надводний листок	7,18 ± 0,21	5,61 ± 0,35	12,8	20,7	23,7	42,8	0
Суходільна рослина/другий листок	10,75 ± 0,54	4,67 ± 0,27	0	8,7	14,5	21,7	5,7

Таблиця 2. Кількісна характеристика хлоропластів клітин мезофілу веху, який зростає у воді та на суходолі

Екотип веху/ тип листка	Хлоропласт		Крохмальне зерно		
	довга вісь, мкм	коротка вісь, мкм	довга вісь, мкм	коротка вісь, мкм	кількість зерен крохмалю на хлоропласт
Водна рослина/другий надводний листок	6,058 ± 0,275	2,339 ± 0,142	1,557 ± 0,108	0,847 ± 0,083	1,943 ± 0,239
Суходільна рослина/другий листок	4,168 ± 0,098	1,144 ± 0,057	0,837 ± 0,066	0,180 ± 0,027	0,412 ± 0,086

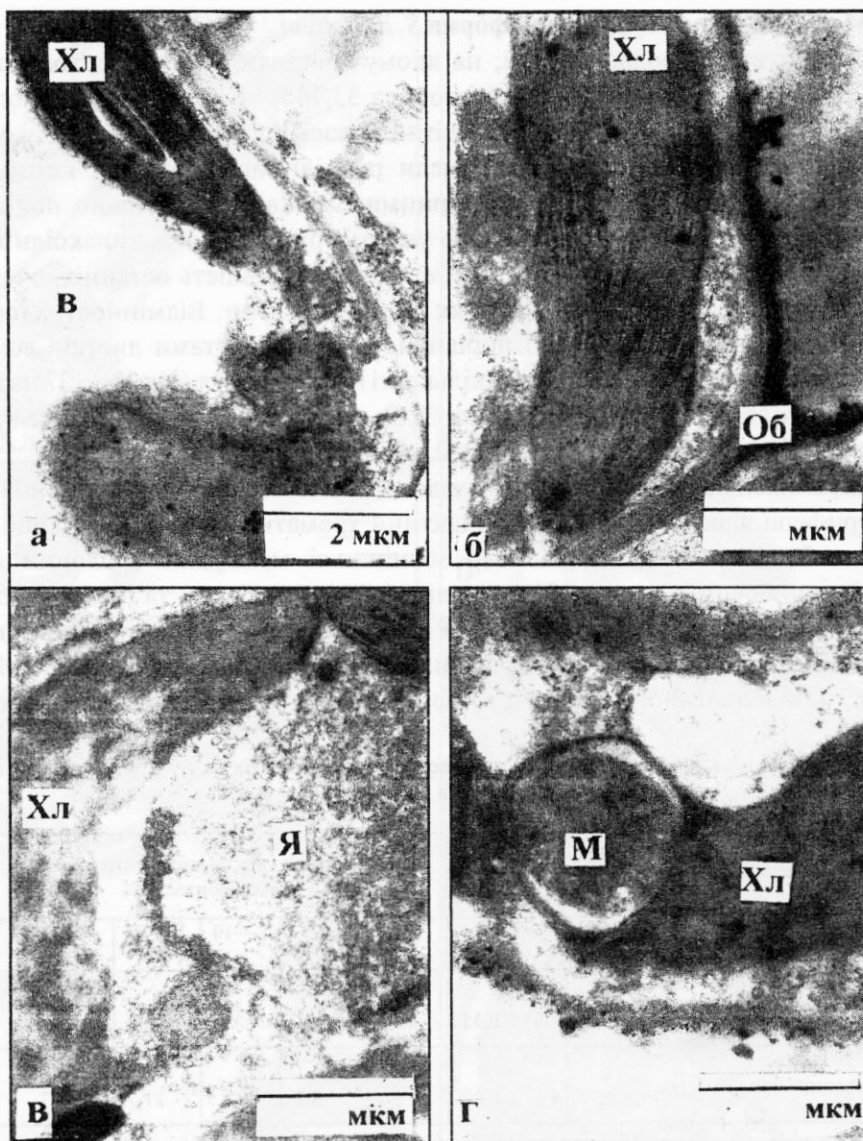


Рис. 2. Фрагменти клітин листків суходільного еко типу *S. latifolium*: В — вакуоль, М — мітохондрія, Хл — хлоропласт, Об — клітинна оболонка, Я — ядро

Fig. 2. The fragments of leaf cells of *S. latifolium* terrestrial ecotype: В — vacuole, М — mitochondria, Хл — chloroplast, Об — cell wall, Я — nucleus

(рис. 2, а, б). Розмір довгої осі мітохондрій становив 1,0–1,5 мкм, короткої— 0,5–0,7 мкм. Пероксисоми округлої форми, діаметром від 0,5 до 0,8 мкм, також контактували із пластидами (рис. 3, а).

Вміст фотосинтезуючих пігментів

Визначення вмісту фотосинтезуючих пігментів у листових пластинках *S. latifolium* засвідчило, що у водної форми червненого збору вміст хлорофі-

лу a та суми хлорофілів ($a+b$) значно перевищував такий у листках суходільних рослин; тимчасом як вміст хлорофілу b у них майже не відрізнявся. Співвідношення хлорофілів b/a та вміст каротиноїдів значно збільшувалися у листках суходільних рослин веху (табл. 3).

Таким чином, дослідження ультраструктури клітин мезофілу надводних листків водної форми веху виявило характерні для мезофітів ознаки хлоропластів, мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму. Порівняння ультраструктури клітин мезофілу листків водних форм веху з такими суходільних форм показало певні відмінності у структурі хлоропластів. Цікавим було зменшення розміру крохмальних зерен та їх кількості у 4,7 раза порівняно з такими у пластидах водних форм веху. Як відомо, первинний крохмаль відкладається у хлоропласті при переповненні його триозофосфатами, що не встигають виводитись із пластиди під час фотосинтезу [6]. Ці матеріали дають можливість припустити, що в умовах помірного водного дефіциту відбуваються зміни як у синтезі крохмалю, так і в перерозподілі триозофосфатів [8]. Крім того, наші дані підтверджуються відомостями літератури про те, що у листках гідрофітів, які ростуть під водою (при розсіянні світла), спостерігається суттєво менше включення ^{14}C у сахарозу та крохмаль порівняно з листками тих самих гідрофітів, що ростуть над поверхнею води [5].

Інша особливість структури хлоропластів листків водного екотипу веху, за якою вони відрізнялися від хлоропластів листків суходільного екотипу, — це більша кількість тилакоїдів у гранах. Подібні грани з великим числом тилакоїдів раніше описала Т.К. Горишина [5] у пластидах тіньовитривалих рослин та підводних листків гідрофітів. Крім цього, ми виявили незначні, але вже помітні ознаки деструкції пластид, пов'язані з розбуханням тилакоїдів, збільшенням вмісту та розмірів пластоглобул, а також ущільненням стромми, типові для хлоропластів листків, які починають старіти [4], або ж зазнають водному стресу [7]. Одержані нами експериментальні результати та вищезгадані відомості літератури дають можливість припустити, що на структуру клітин мезофілу листків суходільної форми

Таблиця 3. Вміст пігментів у різних листових пластинках водного та суходільного екотипів *S. latifolium*

Пігмент	Вміст пігментів у листових пластинках різних екотипів веху	
	водна форма	суходільна форма
Хлорофіл a :		
мг/г сирої маси	1,009	0,477
мг/г сухої маси	1,347	0,557
Хлорофіл b :		
мг/г сирої маси	0,591	0,560
мг/г сухої маси	0,665	0,653
Хлорофіли $a+b$:		
мг/г сирої маси	1,600	1,037
мг/г сухої маси	2,012	1,210
Відношення хлорофілів b/a :		
на сиру масу	0,585	1,174
на суху масу	0,494	1,172
Каротиноїди:		
мг/г сирої маси	0,391	0,698
мг/г сухої маси	0,440	0,814

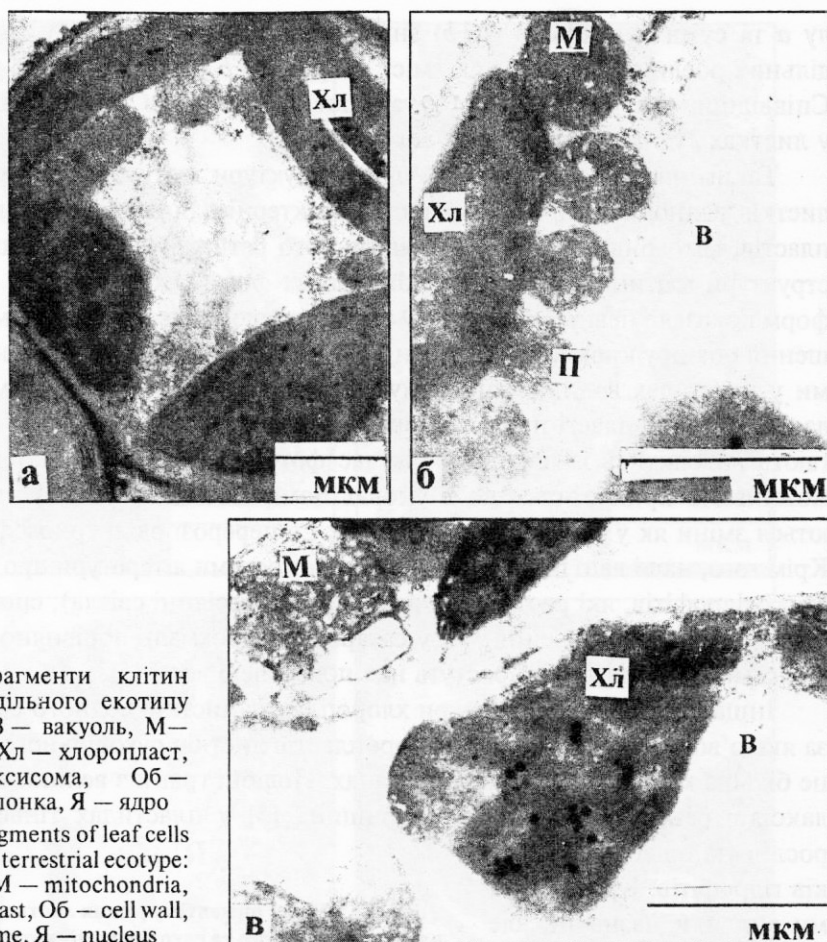


Рис. 3. Фрагменти клітин листків суходільного екотипу *S. latifolium*: В — вакуоль, М — мітохондрія, Хл — хлоропласт, П — пероксисома, Об — клітинна оболонка, Я — ядро

Fig. 3. The fragments of leaf cells of *S. latifolium* terrestrial ecotype: В — vacuole, М — mitochondria, Хл — chloroplast, Об — cell wall, П — peroxysome, Я — nucleus

веху впливають як ріст у постійному затінку, так і знижений вміст води у ґрунті, величина якого була на 38,08 % меншою, ніж така у ґрунті, де зростала водна форма веху.

Визначене нами збільшення співвідношення хлорофілів $6/2$ у листках суходільних форм веху стосовно водних рослин є типовим для тіньовитривалих рослин [5], у яких кількість тилакоїдів у грані збільшується порівняно з хлоропластами листків рослин, що зростають не в затінку [5, 8]. Наступна ознака листків суходільних форм веху — це збільшений удвічі вміст каротиноїдів порівняно з таким у водних форм. Відомо, що каротиноїди беруть участь у фотосинтезі, сприймаючи квантові потоки лише у синій області спектра, що характерно для затінених місцевостей [5, 8]. Тому ми припускаємо, що зміни вмісту фотосинтезуючих пігментів у хлоропластах рослин веху можуть спричинятися дією певної частини сонячного спектра у затінку.

Крім того, відомо, що збільшення вмісту каротиноїдів є характерною рисою пластид в умовах водного дефіциту [11]. Виявлене нами у певної час-

тини клітин порушення структури тилакоїдів та їх ущільнення за умов помірного водного дефіциту, очевидно, можна пояснити деградацією мембранних фосфоліпідів, яка описана дослідниками у хлоропластах при сильному зневодненні рослин [17]. За даними літератури такі зміни відбуваються у хлоропластах за рахунок катаболічних процесів, деградації фосфоліпідів та посилення перекисного окиснення ліпідів, що призводить до утворення вільних радикалів та зниження швидкості фотосинтезу [16]. Утворені в умовах водного дефіциту токсичні супероксидні вільні аніон-радикали (O_2^-) частково нейтралізуються каталазою та пероксидазою. Крім цього, такі супероксидні аніони можуть поглинатись каротиноїдами, які виступають протекторами ПОЛ [11]. Саме цим, очевидно, і пояснюється збільшений вміст каротиноїдів у листках суходільного екотипу веху. Таким чином, одержані дані щодо вмісту пігментів у суходільних і водних рослинах веху та відносно ультраструктури клітин мезофілу свідчать про те, що досліджувані біохімічні та структурні ознаки проявляють фенотипічну пластичність на фазі цвітіння рослини.

Висновки

1. Ультраструктура клітин мезофілу листків водного екотипу веху у фазі цвітіння має типові ознаки клітин мезофітів.
2. Мезофіл листків суходільних форм веху характеризується зниженням розміру хлоропластів та вмісту крохмальних зерен, вищим вмістом тилакоїдів у гранах і частковою деструкцією тилакоїдів.
3. Виявлено відмінності у вмісті фотосинтезуючих пігментів у листках водного та суходільного екотипів веху.

1. *Белявская Н.А.* Локализация кальция в клетках апексов корней *Alisma plantago-aquatica* L., произрастающих в разных условиях водного режима // Цитология и генетика. — 1997. — 31, № 3. — С. 12—17.
2. *Белявская Н.А., Кордюм Е.Л.* Ультраструктурная организация клеток апексов корней растений *Alisma plantago-aquatica* L., произрастающих в разных условиях водного режима // Цитология и генетика. — 1995. — 29, № 3. — С. 12—17.
3. *Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М.* Большой практикум по физиологии растений. — М.: Высш. шк., 1975. — 390 с.
4. *Гамалей Ю.В., Куликов Г.В.* Развитие хлоренхимы листа. — Л.: Наука, 1978. — 191 с.
5. *Горышина Т.К.* Фотосинтетический аппарат растений и условия среды. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1989. — 202 с.
6. *Курсанов А.Л.* Транспорт ассимилятов в растении. — М.: Наука, 1976. — 646 с.
7. *Недуга О.М., Кордюм Е.Л., Овруцька І.І.* Фенотипічні зміни листової пластинки *Alisma plantago-aquatica* L. при водному дефіциті. II. Ультраструктурний та пігментний склад // Укр. ботан. журн. — 1998. — 55, № 6. — С. 591—597.
8. *Полевой В. В.* Физиология растений. — М.: Высш. шк., 1989. — 464 с.
9. *Силаева А. М.* Структура хлоропластов и факторы среды. — Киев: Наук. думка, 1978. — 201 с.
10. *Ситник К.М., Мусатенко Л.І., Мартин Г.І. та ін.* Вплив водного дефіциту на ріст і фітогормональний комплекс первинного листка у фазі поділу клітин // Укр. ботан. журн. — 2003. — 60, № 4. — С. 366—372.

11. Таран Н.Ю. Каротиноїди фотосинтетичних тканин за умов посухи // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1999. — 31, № 6. — С. 414—422.
12. Шматько И. Г., Григорюк И.А., Шведова О.Е. Устойчивость растений к водному и температурному стрессам. — Киев: Наук. думка, 1989. — 224 с.
13. Штефьрицэ А., Бужоряну В.В., Кушниренко М.Д. Ультраструктура митохондрий корней яблони при изменении влажности почвы // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1987. — 19, № 2. — С. 189—194.
14. Biehler K., Fock H. Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat // Plant Physiol. — 1996. — 112. — P. 265—272.
15. Chen Shao-Yu, Lie Jie. Influence of water stress on membrane mitochondria of sugar-cane and its attitude to POL // Acta Phytophysiol. Sin. — 1991. — 17, № 3. — P. 285—289.
16. Wang Bang-Xi, He Jun-Xiao, Huang Jiu-Chang. Induced by water stress and undepended from stomata factors that acted to the decrease of photosynthesis speed // Acta Phytophysiol. Sin. — 1992. — 18. — P. 77—84.
17. Wilson R.F., Burke J., Quisenberry J. Plant morphological and biochemical responses to field water deficits: responses to leaf glycerolipid composition in cotton // Plant Physiol. — 1987. — 84. — P. 251—254.

Рекомендує до друку
Є.Л. Кордюм

Надійшла 30.12.2003

О.М. Недуха

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ЛИСТЬЕВ *SIUM LATIFOLIUM* L. ПРИ ВОДНОМ ДЕФИЦИТЕ

Проведен сравнительный анализ ультраструктуры клеток мезофилла и состава пигментов листьев *Sium latifolium* L., произрастающего в природных условиях на суше и в воде. Установлены отличия в ультраструктуре исследуемых клеток, содержании хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов, свидетельствующие о влиянии умеренного водного дефицита и освещения на структурно-функциональную организацию фотосинтезирующих клеток *S. latifolium*.

О.М. Nedukha

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PHENOTYPICAL CHANGES OF *SIUM LATIFOLIUM* L. LEAVES UNDER INFLUENCE OF WATER DEFICITE

The comparative analysis of mesophyll cells ultrastructure and the pigments content have been carried in leaves of *Sium latifolium* L., which was grown in natural conditions in water and in land. The distinguishing features in investigated cell ultrastructure and in chlorophyll *a* and *b*, and carotynoids content were established. These differences testify about the influence of moderate water deficit and light to structural-functional cell organization of *S. latifolium* photosynthesizing cells.