

УДК 582.751.4:581.45:581.132.1

МОРФОЛОГИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ РАЗНОГО ВОЗРАСТА ХЛОРОФИЛЛЬНЫХ МУТАНТОВ ЛЬНА

В.В. ЯРАНЦЕВА, В.А. ЛЯХ

Запорожский национальный университет
69063 Запорожье, ул. Жуковского, 66
e-mail: VIKA.yaran@mail.ru

Изучены содержание основных фотосинтетических пигментов и морфология хлоропластов в разновозрастных листьях зеленых растений и хлорофилл-дефицитных мутантов льна. Установлено, что количество фотосинтетических пигментов у мутантов зависит от степени развитости листьев и типа мутации, а у зеленых растений существенно не изменяется. В дефинитивных листьях мутантов и зеленых растений увеличиваются линейные размеры, площадь сечения и объем хлоропластов, при этом мутант типа *xantha* имеет измененную форму хлоропластов по сравнению с контролем.

Ключевые слова: *Linum humile* Mill., хлорофилльная недостаточность, возраст листьев, хлоропласты, фотосинтетические пигменты, морфология.

Процесс фотосинтеза и возможность регулирования фотосинтетической деятельности растений изучаются уже более 200 лет, однако и сегодня остаются важными вопросами современной физиологии растений. Одним из удобных объектов для проведения исследований являются растения мутантной природы с хлорофилльной недостаточностью [5]. Интенсивность фотосинтеза у большинства хлорофилльных мутантов существенно ниже, чем у зеленых растений. Вместе с тем к настоящему времени выделены мутанты с хорошо развитым фотосинтетическим аппаратом и высокой продуктивностью растений [12].

Лен культивируется в разных климатических условиях, что свидетельствует о его пластичности и высокой адаптивной способности [6, 7, 9]. В генетической коллекции льна масличного Запорожского национального университета имеется серия мутантных образцов с разным типом минус-хлорофилльных изменений [12, 13]. Эти мутанты были выделены при обработке семян льна масличного (*Linum humile* Mill.) мутагенами различной природы. Хлорофилльные мутанты легко идентифицируются от всходов до цветения и могут представлять интерес для изучения процессов фотосинтеза.

На физиологическое состояние листьев влияет их возраст [6]. Исследования, касающиеся возрастной динамики морфологии хлоропластов и содержания в них основных фотосинтетических пигментов, у мутантных линий в зависимости от типа мутации нам не известны.

Целью данной работы было сравнение морфологических показателей хлоропластов и их пигментного состава в листьях разного возраста у хлорофилльных мутантов льна и зеленых растений.

Методика

Исследовали растения, выращенные в полевых условиях: сорт льна масличного Циан, полученная на его основе мутантная линия М-81; коллекционный образец льна масличного К-7487, его мутантная линия М-28.

Мутантная линия М-81 отнесена к типу хлорофильной недостаточности *xantha* [12]. В фазу бутонизации она имела характерную ярко-желтую окраску листьев в верхней части растения. По мере роста растения пигментация этих листьев менялась и в фазу цветения, после окончания роста листьев, они имели уже светло-зеленую окраску. Растения, сохраняя признаки угнетенности, доживали до конца вегетации и завязывали семена.

Мутантная линия М-28 отнесена к типу хлорофильной недостаточности *viridis* [12]. В фазу бутонизации в верхней части растения листья имели светло-зеленую окраску с желтоватым оттенком. Визуально цвет этих листьев сохранялся по мере роста растения вплоть до фазы цветения. Растения не проявляли признаков угнетенности и характеризовались достаточно высокой продуктивностью.

Для анализа у мутантных линий и их исходных форм отбирали ювенильные листья (не закончившие рост) с верхней части растения в фазу бутонизации и дефинитивные листья (полностью сформированные) с верхней части растения в фазу цветения.

Количество основных фотосинтетических пигментов и анатомо-морфологических особенностей пластидного аппарата анализировали одновременно.

Пигменты фотосинтетического аппарата определяли спектрофотометрически при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов: 470, 646 и 663 нм. Расчет производили по формуле для экстракции в 80 %-м ацетоне [2, 17].

Для исследования морфологии хлоропластов отобранные листья фиксировали в смеси Темпера, содержащей 0,2 % хлорида меди, 0,2 % нитрата меди и 1 % фенола [2], которая сохраняла их окраску. Затем листья парафинировали, из них готовили поперечные срезы на ротационном микротоме МПС-2 и депарафинировали. Для этого стекла с наклеенными срезами промывали тремя порциями ксилола, двумя — 100 %-го спирта, одной — 75 %-го спирта, одной — 50 %-го спирта и тремя порциями дистиллированной воды. Время нахождения в каждой среде — 2–3 мин. Далее срезы помещали в глицерин и накрывали покровными стеклами [2, 17]. Полученные препараты фотографировали с помощью тринокулярного микроскопа XS-3330 и окулярной камеры МА88-500 при увеличении $\times 640$ и $\times 1600$ раз. Размеры хлоропластов и клеток (длину и ширину) измеряли стандартными методами с помощью окулярмикрометра [17]. Для характеристики пластидного аппарата рассчитывали площадь сечения и объем хлоропластов по методике Мокроносова [15].

Результаты обработаны методами стандартной математической статистики [11].

Результаты и обсуждение

Степень развития фотосинтетического аппарата является важным показателем нормального роста и продуктивности растений, дает представление о потенциальных возможностях растений развиваться и формировать урожай [1, 8, 18].

В результате изучения количества основных фотосинтетических пигментов зеленых листьев контрольных растений Циан и К-7487 было выявлено, что в ювенильных и дефинитивных листьях количество хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов существенно не отличается (табл. 1).

Сравнив пигментный состав листьев хлорофилльного мутанта М-81 с исходной линией (зеленое растение) мы установили, что в ювенильных листьях мутанта количество хлорофилла *a* существенно не отличается, количество хлорофилла *b* достоверно ниже, а количество каротиноидов почти в 2 раза выше. В дефинитивных листьях этого хлорофилльного мутанта количество всех фотосинтетических пигментов уменьшено. Однако по сравнению с ювенильными листьями в дефинитивных листьях количество хлорофилла *a* снижается на 25 %, хлорофилла *b* — возрастает на 50 %, а каротиноидов — снижается и не превышает контрольных показателей.

У хлорофилл-дефицитного мутанта М-28 в ювенильных листьях также снижается количество хлорофилла *b*, в то время как количество хлорофилла *a* существенно не меняется по сравнению с исходной формой, а каротиноидов больше. В дефинитивных листьях, как и у мутанта М-81, всех фотосинтетических пигментов также меньше, чем у исходной формы. Сравнив ювенильные и дефинитивные листья данного мутанта, можно отметить увеличение в последних количества хлорофилла *b* на 32 %, а количества хлорофилла *a* и каротиноидов снизились соответственно на 29 и 55 %.

Что касается каротиноидов, то в ювенильных листьях хлорофилльных мутантов их содержание повышено как относительно дефинитивных листьев этих мутантов, так и ювенильных и дефинитивных листьев зеленых растений. Известно, что они являются одной из составляющих комплексной системы защитных механизмов растений [14], так как отводят избыточную энергию от хлорофиллов, выполняя светозащитную функцию [10, 19, 20]. У исследуемых мутантов мутации хлорофилльной недостаточности фенотипически проявлялись в ярко-желто-зеленой окраске молодых (ювенильных) листьев верхушки растений, где каротиноиды, очевидно, стабилизировали структуры мембран при дефиците светособирающего комплекса, о чем свидетельствует значительное снижение содержания хлорофилла *b*.

Следует отметить, что в дефинитивных листьях мутантов независимо от типа мутации всех фотосинтетических пигментов было меньше, чем у зеленых растений. Аналогичную закономерность в изменении пигментного состава в период цветения наблюдали Шимко и соавт. [18] при работе с гибридами ржи, что, по их мнению, отражает адаптационную возможность хлорофилльных показателей при переходе к более поздним стадиям развития растения.

Помимо анализа пигментного состава ювенильных и дефинитивных листьев хлорофилл-дефицитных и зеленых растений нами исследованы особенности морфологии хлоропластов. Выявлено, что хлоропласты ювенильных и дефинитивных листьев зеленых растений имеют эллипсоидную форму, а их размеры с возрастом листа увеличиваются, при этом форма хлоропластов сохраняется. Как следует из данных табл. 2, хлоропласты мутантных линий по линейным размерам существенно отличаются от исходных генотипов.

У мутанта типа *xantha* (М-81) в ювенильных листьях хлоропласты короче и намного уже, чем у исходной формы. На основе соотношения

ТАБЛИЦА 1. Содержание фотосинтетических пигментов (мг%) в ювенильных и дефинитивных листьях хлорофилл-дефицитных мутантов и растений исходных генотипов льна масличного

Генотип	Хлорофилл а		Хлорофилл b		Каротиноиды	
	Ювенильные листья	Дефинитивные листья	Ювенильные листья	Дефинитивные листья	Ювенильные листья	Дефинитивные листья
Циан	98,3±3,8	93,6±4,1	59,4±10,2	57,1±1,4	18,5±3,0	16,3±1,5
М-81	100,8±9,0	75,3±3,4* #	25,1±4,5*	49,5±1,6* ##	35,4±4,6*	6,3±1,0* ##
К-7487	100,2±2,3	92,7±6,5	63,7±10,0	64,1±3,7	23,2±2,7	28,7±3,2
М-28	96,7±4,4	68,4±5,6* #	27,6±3,7*	41,1±2,1* ##	33,0±1,8*	14,7±2,1* #

Примечание. Отличия от контроля существенны при $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Отличия между дефинитивными и ювенильными листьями существенны при $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##).

ТАБЛИЦА 2. Линейные размеры хлоропластов ювенильных и дефинитивных листьев хлорофилл-дефицитных мутантов и растений исходных генотипов льна масличного

Генотип	Длина, хлоропластов, мкм		Ширина хлоропластов, мкм	
	Ювенильные листья	Дефинитивные листья	Ювенильные листья	Дефинитивные листья
Циан	5,4±0,2	6,2±0,3	2,3±0,1	4,1±0,4* #
М-81	4,1±0,3	7,2±0,6* ##	0,8±0,1*	2,4±0,2* ###
К-7487	5,2±0,2	6,5±0,3#	3,3±0,2	4,5±0,2* #
М-28	4,1±0,3	5,3±0,2* ###	2,3±0,1**	3,4±0,2* ###

Примечание. Отличия от контроля существенны при $p < 0,01$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,001$ (***). Отличия между дефинитивными и ювенильными листьями существенны при $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###).

длины и ширины хлоропластов мутанта М-81 было выявлено, что они имеют цилиндрическую форму [16]. В дефинитивных листьях длина хлоропластов этого мутанта существенно не отличалась от их длины в растениях исходного генотипа, а ширина была меньше почти в 2 раза. Сравнив дефинитивные и ювенильные листья между собой, мы установили, что длина хлоропластов дефинитивных листьев возросла на 43, а ширина — на 67 %.

У мутанта типа *viridis* М-28 линейные размеры хлоропластов ювенильных листьев существенно меньше, чем у растений исходного генотипа, однако по форме они не различаются. Эта закономерность сохраняется и в хлоропластах дефинитивных листьев. Следует отметить, что линейные размеры хлоропластов дефинитивных листьев мутанта М-28 больше, чем ювенильных: длина хлоропластов возросла на 23, а ширина — на 32 %.

Линейные размеры хлоропластов непосредственно влияют на площадь их сечения и объем (табл. 3). Площадь сечения и объем хлоропластов зеленых растений увеличиваются с возрастом листа. Эти параметры растут также и у хлорофилл-дефицитных мутантов.

В ювенильных листьях мутанта М-81 по сравнению с зелеными растениями площадь сечения хлоропластов меньше почти в 2,5 раза, а объем — почти в 7 раз. В дефинитивных листьях размер хлоропластов также меньше, чем у зеленого растения (площадь сечения — в 1,1 раза, объем хлоропластов — в 1,5 раза). Сравнив ювенильные и дефинитивные листья данного хлорофилльного мутанта, мы вычислили, что площадь сечения хлоропластов дефинитивных листьев возросла на 82, а объем — на 93 % по сравнению с хлоропластами ювенильных листьев.

В ювенильных листьях мутанта М-28 площадь сечения хлоропластов была меньше почти в 2 раза, а объем — более чем в 2,5 раза, чем у зеленых растений. В дефинитивных листьях такая тенденция сохранялась. Сравнив дефинитивные и ювенильные листья, мы определили, что площадь сечения хлоропластов дефинитивных листьев по сравнению с ювенильными возросла на 50, а объем — на 65 %.

Исследование особенностей морфологии пластидного аппарата показало, что и в зеленых, и в мутантных образцах размеры хлоропластов увеличиваются с возрастом листьев. Это может быть связано как со структурными перестройками, так и с изменением ряда фотосинтетических характеристик хлоропластов. Рост листьев к фазе цветения тормозится, начинают накапливаться резервные и энергоемкие вещества, прежде всего углеводы [4].

Мы выявили, что у хлорофилльного мутанта М-81 изменяется форма хлоропластов. При этом он сохраняет нормальную жизнеспособность и дает плодовитое потомство. Такой тип адаптационной трансформации наблюдался также у злаковых хлорофилл-дефицитных растений [3], что позволяет, как считают авторы, существовать особым с измененным пигментным составом, несмотря на отставание в росте и развитии.

Обобщив полученные данные, следует отметить, что между ювенильными и дефинитивными листьями зеленых растений существенных отличий по количеству фотосинтетических пигментов не наблюдалось, в то время как показатели морфологии хлоропластов у дефинитивных листьев увеличивались. На основании анализа пигментного состава хлорофилльных мутантов установлено, что количество фотосинтетических пигментов зависит от степени развитости листа и типа мутации. Так, в

ТАБЛИЦА 3. Морфологические показатели хлоропластов ювенильных и дефитивных листьев разных генотипов льна масличного

Генотип	Площадь сечения хлоропластов, мкм ²		Объем хлоропластов, мкм ³	
	Ювенильные листья	Дефитивные листья	Ювенильные листья	Дефитивные листья
Циан	29,3±0,6	69,5±1,1 [#]	14,9±1,0	54,5±5,5 [#]
М-81	11,3±0,3 ^{**}	63,3±0,9 ^{*#}	2,1±0,9 ^{**}	32,5±4,5 ^{*#}
К-7487	46,3±1,2	81,2±1,3 [#]	29,6±1,0	68,9±4,7 [#]
М-28	24,4±1,8 ^{**}	48,8±1,1 ^{**#}	11,3±1,2 ^{**}	32,1±3,3 ^{**#}

П р и м е ч а н и е: Отличия от контроля существенны при $p < 0,01$ (*), $p < 0,001$ (**). Отличия между дефитивными и ювенильными листьями существенны при $p < 0,001$ (#).

дефинитивных листьях по сравнению с ювенильными у хлорофилльных мутантов типов *xantha* и *viridis* количество хлорофилла *a* и каротиноидов снижается в разной степени, а количество хлорофилла *b* — повышается в зависимости от типа мутации. В дефинитивных листьях мутантов увеличиваются линейные размеры, площадь сечения и объем хлоропластов, при этом мутант типа *xantha* по сравнению с исходным сортом изменяет форму хлоропластов с эллипсоидной на цилиндрикоподобную, которая сохраняется как в ювенильных, так и в дефинитивных листьях.

1. Андрианова Ю.Е., Тарчевский И.А. Хлорофилл и продуктивность растений. — М.: Наука, 2000. — 135 с.
2. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. Справочник по ботанической микро-технике. Основы и методы. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. — 312 с.
3. Венжик Ю.В. Анатомо-морфологическая характеристика растений *Festuca pratensis* Huds. с температурозависимой хлорофилл-дефектностью: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Петрозаводск, 2001. — 24 с.
4. Венжик Ю.В., Титов Ю.В., Венжик А.Ф., Таланова В.В. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодовой адаптации // Цитология. — 2012. — 54, № 12. — С. 916–923.
5. Гостимский С.А. Цитогенетический анализ хлорофилльных мутантов гороха // Теория химического мутагенеза. — М.: Наука, 1971. — С. 64–69.
6. Елагина Е.М. Значение фитогормонов в регуляции возрастных изменений листьев пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Москва, 1995. — 20 с.
7. Живетин В.В., Гинзбург Л.Н. Масличный лен и его комплексное использование. — М.: Урожай, 2000. — 90 с.
8. Коф Э.М., Ооржак А.С., Виноградова И.А. и др. Листовой аппарат, пигментный комплекс и продуктивность дикого и афильного генотипов гороха // Физиология растений. — 2004. — 51, № 4. — С. 500–506.
9. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений. — К.: Альтерпрес, 2001. — 204 с.
10. Ладыгин В.Г., Ширшикова В.Г. Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот // Журн. общ. биологии. — 2006. — 67, № 3. — С. 163–189.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 351 с.
12. Лях В.А., Полякова И.А., Сорока А.И. Индуцированный мутагенез масличных культур. — Запорожье: Изд-во Запорож. нац. ун-та, 2009. — 266 с.
13. Лях В.А., Сорока А.И. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологические пути работы с ними. — Запорожье: Изд-во Запорож. нац. ун-та, 2008. — 182 с.
14. Маслова Т.Г., Мамушина Н.С., Шерстнева О.А. и др. Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата у зимневегетирующих хвойных растений в различные сезоны года // Физиология растений. — 2009. — 56, № 5. — С. 672–681.
15. Мокроносов А.Т., Борзенкова Р.А. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 1978. — Вып. 61, № 3. — С. 119–133.
16. Определение мезоструктурных характеристик фотосинтетического аппарата растений: руководство к лабораторным занятиям большого спецпрактикума по физиологии и биохимии растений / Сост. Р.А. Борзенкова, Е.В. Храмцова. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2006. — 27 с.
17. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
18. Шимко В.Е., Кульминская И.В., Калитуха Л.Н., Гордей И.А. Сравнительный анализ показателей фотосинтеза и продуктивности у гибридов F₂ озимой ржи // Физиология растений. — 2009. — 56, № 1. — С. 139–145.
19. Demmig-Adams B., Gilmore A.M., Adams W.W. III. In vivo functions of carotenoids in higher plants // FASEB J. — 1996. — 10, N 1. — P. 403–412.
20. Pogson B.J., Rissler H.M., Frank H.A. The roles of carotenoids in photosystem II of higher plants // Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase / Eds. T. Wydrzynski, K. Satoh. — Dordrecht: Springer-Verlag, 2005. — P. 515–537.

Получено 20.10.2014

МОРФОЛОГІЯ ХЛОРОПЛАСТІВ ТА ПІГМЕНТНИЙ СКЛАД ЛИСТКІВ РІЗНОГО
ВІКУ ХЛОРОФІЛЬНИХ МУТАНТІВ ЛЬОНУ

В.В. Яранцева, В.О. Лях

Запорізький національний університет

Вивчено вміст основних фотосинтетичних пігментів та морфологію хлоропластів у листках різного віку зелених рослин і хлорофіл-дефіцитних мутантів льону. Встановлено, що кількість фотосинтетичних пігментів у мутантів залежить від ступеня розвиненості листків і типу мутації, а в зелених рослин істотно не змінюється. В дефінітивних листках мутантів і зелених рослин збільшуються лінійні розміри, площа перетину та об'єм хлоропластів, при цьому мутант типу *xantha* має змінену форму хлоропластів порівняно з контролем.

MORPHOLOGY OF CHLOROPLASTS AND PIGMENT COMPOSITION IN LEAVES OF
DIFFERENT AGE OF FLAX CHLOROPHYLL-DEFICIENT MUTANTS

V.V. Yarantseva, V.O. Lyakh

Zaporizhzhya National University
66 Zhukovskogo St., Zaporizhzhya, 69600, Ukraine

The content of the main photosynthetic pigments and morphology of chloroplasts in leaves of different age in green and chlorophyll-deficient mutants of flax were studied. It was revealed that the content of photosynthetic pigments depends on the extent of leaf development and the type of mutation, while in green plants it did not significantly changed. In definitive leaves of the mutants and green plants, an increase in linear dimensions, cross-sectional area and volume of chloroplasts was observed. Besides, the chloroplast shape of *xantha* type mutant was changed compared to the control.

Key words: *Linum humile* Mill., chlorophyll-deficiency, age of the leaves, chloroplasts, photosynthetic pigments, morphology.