



УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИН ТА АНАЛІЗ ПІГМЕНТІВ ПЛАВАЮЧИХ І ПІДВОДНИХ ЛИСТКІВ *TRAPA NATANS* L.

ОЛЕНА М. НЕДУХА

Анотація. Представлено результати порівняльного аналізу ультраструктури фотосинтезуючих клітин і вмісту пігментів у плаваючих і підводних листках *Trapa natans*. Встановлено, що зміни ультраструктури досліджуваних клітин й вмісту пігментів залежать від розміщення листків у воді чи над водою. Показано, що функціонування листків, занурених у воду, призводить до збільшення кількості тилакоїдів у гранах, зменшення кількості хлоропластів з крохмалем, зниження відношення хлорофілів (Chla / Chlb) та їхньої суми (Chla + Chlb).

Ключові слова: ультраструктура мезофілу, листок, фотосинтезуючі пігменти, *Trapa natans*

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, 01601, Київ, Україна; o.nedukha@hotmail.com

Вступ

Дослідження структурно-функціональної організації листків і коренів вищих водних рослин, які постійно зростають у воді, важливі для розуміння механізмів стійкості рослин до умов затоплення. Проте, більшість робіт проведена по вивченню біохімічних ознак фотосинтезуючого апарату або ж структурних особливостей затоплених коренів (BRAY *et al.* 2001). В ході попередніх досліджень, проведених на листках *Ranunculus flabellaris* Raf., *Hippuris vulgaris* L., *Marsilea quadrifolia* L. і *Potamogeton nodosus* Poit. встановлено, що для підводних листків характерним є зниження активності CO₂ (SAND-JENSEN & FROST-CHRISTENSEN 1999) і зменшення синтезу фотосинтезуючих пігментів, порівняно із надводними чи плаваючими листками гідрофітів (НЕКРАСОВА *и др.* 1998; YANG *et al.* 1987, 1990; RYEN 1985). Вивчення ультраструктури хлоропластів в основному проводилося лише на видах, листки яких зростають у воді (НЕДУХА 2010), і дуже рідко порівнювали ультраструктуру клітин підводних і надводних листків для одного виду (YANG *et al.* 1990). Тому метою нашої роботи було порівняти ультраструктурні характеристики і біохімічні ознаки підводних і плаваючих листків водяного горіха (*Trapa natans* L.), для якого характерна гетерофілія.

Матеріали і методи досліджень

Листки водяного горіха збирали в середині червня у прибережній зоні Русанівського каналу (р. Дніпро, м. Київ). Рослини зростали

на глибині до 80 см. Листки *T. natans* у фазі вегетативного росту відрізнялися за формою: плаваючі листки, які формували розетку, мали цілісну пластинку у формі трикутника і довгий черешок, листки занурені у воду були розсіченими із голкоподібними сегментами. Для просвічуючої електронної мікроскопії для трьох рослин брали кожен третій сегмент із другого і третього розсіченого підводного листка і перший плаваючий листок з розетки.

Відібраний матеріал фіксували у польових умовах опівдні охолодженням 2,5%-м глютаровим альдегідом на 0,5 М какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 6 годин, потім дофіксували 2%-м OsO₄ на ідентичному буфері протягом 12-14 годин при +4°C. Зневоднювали етанолом та ацетоном і заливали у суміш епоксидних смол (епон/аралдит) (Недуха 2004). Ультраструктуру клітин досліджували під електронним мікроскопом JEM 1200EX. Для визначення вмісту фотосинтезуючих пігментів брали по 4-6 підводних і по 4 плаваючих листка (без серединної жилки) з 4-6 рослин. Половину матеріалу залишали для визначення сухої маси, із другої половини виділяли пігменти за методом Гавриленко *та ін.* (1975). Останні екстрагували 85%-м ацетоном і визначали на спектрофотометрі СФ-2000 за формулами Робелена та Ветштейна (Гавриленко *та ін.* 1975).

Результати та їх обговорення

Плаваючі листки. Аналіз ультраструктури клітин палисадної паренхіми листкових пластинок показав, що клітини мають велику центральну вакуолю, цитоплазма з

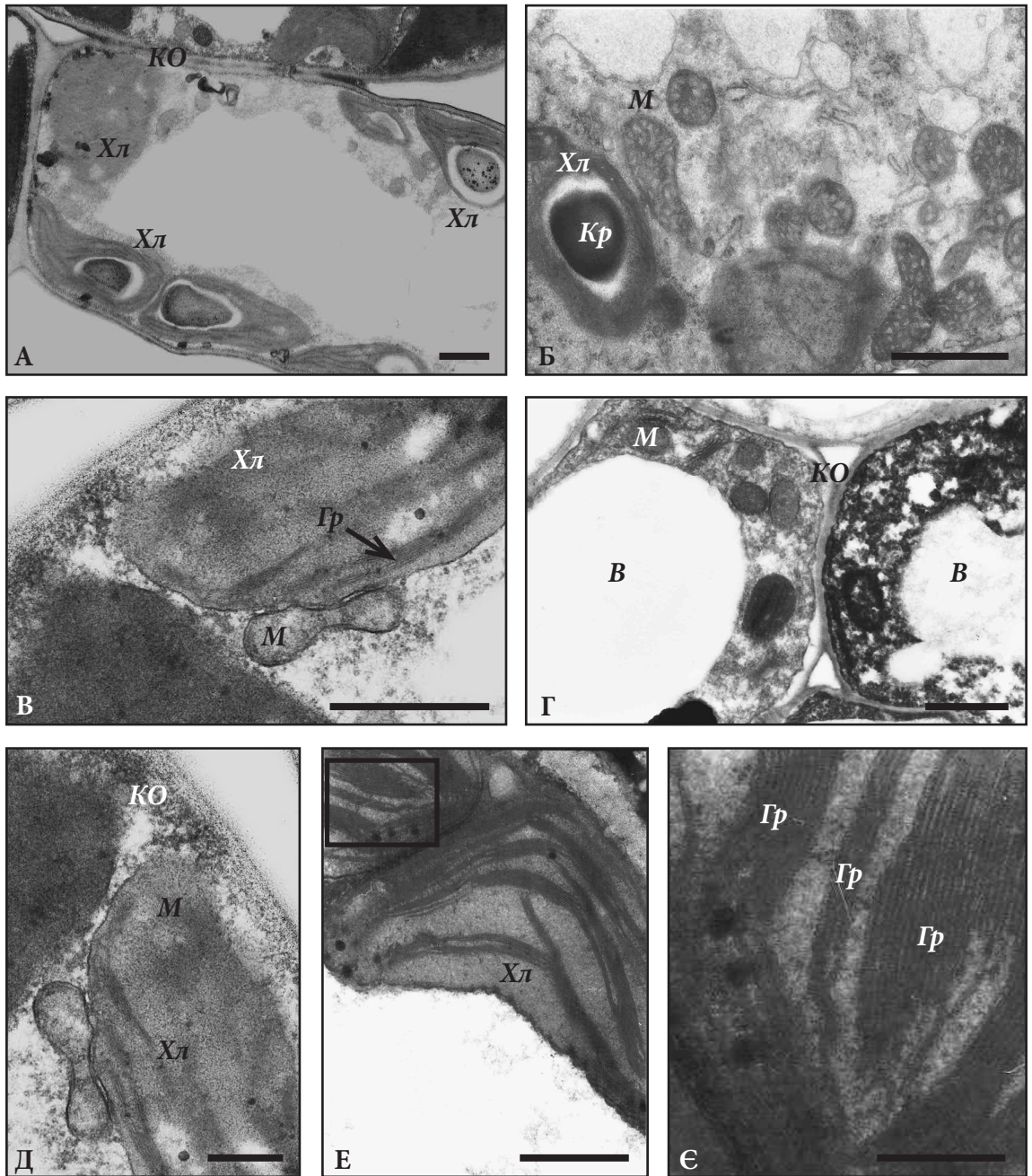


Рис. 1. Фрагменти клітин мезофілу плаваючих (А-В) і підводних розсічених (Г-Є) листків *Trapa natans*: Гр – грана хлоропласта, Кр – крохмальне зерно, М – мітохондрія, Хл – хлоропласт, КО – клітинна оболонка. На рисунку Є представлено збільшений фрагмент хлоропласта з рисунку Е. Реперна мітка для А-Е = 1 мкм, для Є = 0,2 мкм.

Fig. 1. The fragments of mesophyll cells of floating (A-B) and submerged (Г-Є) leaves of *Trapa natans*: Гр – grana of chloroplast, Кр – starch grain, М – mitochondria, Хл – chloroplast, КО – cell wall. The increased fragment of chloroplast from figure E is represented on figure Є. Bar for A-E = 1 μm , for Є = 0,2 μm .

органелами розміщується вздовж клітинних оболонок (Рис. 1 А). Хлоропласти мезофілу лінзоподібної й овальної форми (Рис. 1 А, Б). Середній розмір лінзоподібних хлоропластів

становить 3,5-4×1,2-2 мкм. В центрі хлоропласта розміщене велике крохмальне зерно, форма якого відповідає формі хлоропласта на зрізі. Середній розмір крохмального зерна становить

2×1 мкм. Кількість крохмальних зерен на серединному зрізі хлоропласта становить $2,1 \pm 0,09$. Грани в хлоропластах невеликі, їхній діаметр коливається від 0,4 до 0,6 мкм, грани містять від двох до шести тилакоїдів (Рис. 1 В). Гетерогенна популяція мітохондрій конденсованого типу (Рис. 1 Б). Овальні ($1,2 \times 0,5$ мкм) і округлі (діаметром $\approx 0,6$ мкм) мітохондрії часто контактують з хлоропластами. В цитоплазмі виявлено багато вільних рибосом і гранулярний ендоплазматичний ретикулум. Клітинні оболонки товщиною біля 0,2-0,3 мкм.

Підводні розсічені листки. Паренхімні клітини вакуолізовані (Рис. 1 Г). Хлоропласти великі ($3,5 \times 1,2$ мкм), лінзоподібної форми, витягнуті (Рис. 1 Д) або ж зігнуті (Рис. 1 Е). Кількість тилакоїдів в гранах досить велика і коливалася від 2 до 17 (Рис. 1 Е, Є), діаметр гран коливався від 0,2 до 0,5 мкм. Крохмаль присутній дуже рідко, а кількість крохмальних зерен на серединному зрізі хлоропласта становить $0,2 \pm 0,01$. Розмір поодиноких зерен крохмалю майже у п'ять разів менший, ніж у хлоропластів плаваючих листків. У щільній стромі спостерігається від 6 до 20 пластоглобул, діаметр яких сягає 50 нм (Рис. 1 Е, Є). Популяція мітохондрій гетерогенна. Округлі і овальні мітохондрії відрізняються розвинутою системою крист (Рис. 1 Г). Ендоплазматичний ретикулум гранулярного типу, зрідка контактує з хлоропластами. Цитоплазматична мембрана хвиляста із підвищеною електронною щільністю (Рис. 1 Д). У середньому товщина клітинних оболонок становить 0,3 мкм. Необхідно відмітити, що у деяких клітинах паренхіми інтактних хлоропластів не спостерігалось, цитоплазматичні органели були зруйновані, в цитоплазмі було видно електроннощільні структури (можливо танінової природи) (Рис. 1 Г – клітина зліва).

Біохімічний аналіз плаваючих і підводних листків водяного горіха у фазі вегетативного росту показав наявність двох типів хлорофілу і каротиноїдів, вміст яких у плаваючих листків був достовірно більшим, ніж у підводних (Рис. 2). Виявлено, що відношення хлорофілу а до хлорофілу b, як і сума хлорофілів були достовірно меншими у підводних листках, ніж у плаваючих. Отримані біохімічні дані корелюють з даними по ультраструктурі хлоропластів у досліджуваних листках, зокрема формуванням гран з великою кількістю тилакоїдів у хлоропластах підводних

листіків.

Таким чином, проведені дослідження виявили відмінності структури хлоропластів. Ми встановили, що ультраструктура клітин палисадної паренхіми плаваючих листків подібна до мезофітних рослин (Гамалей и Куликов 1978). Зокрема, у хлоропластах присутня велика кількість гран з 2-6 тилакоїдами, а крохмальні зерна формуються значних розмірів. Тоді як ультраструктура фотосинтезуючої паренхіми підводних листків *T. natans* подібна до такої у тіншовитривалих рослин і зумовлена посиленням синтезом хлорофілу b (Горышкина 1989). Другою особливістю структури хлоропластів підводних листків водяного горіха, яка відрізняє їх від хлоропластів плаваючих листків, є менша кількість крохмалю. Для листків, занурених у воду характерне зниження кількості хлоропластів із крохмалем майже на порядок, у порівнянні із плаваючими листками. Це підтверджується даними Г.Ф. Некрасової зі співавторами (Некрасова и др. 2003), які показали достовірне зменшення включення ^{14}C у крохмаль підводних листків багатьох гідрофітів, порівняно з плаваючими і надводними листками. Ще одна виявлена нами особливість підводних листків водяного горіха – зниження сумарного вмісту хлорофілів (Chl a+Chl b) у 1,7 разів і достовірне зниження співвідношення хлорофілів Chl a / Chl b, порівняно з показниками плаваючих листків (Рис. 2). Як відомо, ці ознаки характерні для рослин, що ростуть у затінку та в умовах низької освітленості (Зауралова 1980; Некрасова и др. 1998).

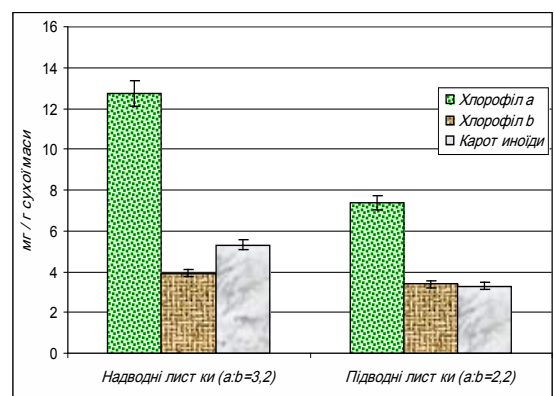


Рис. 2. Вміст фотосинтезуючих пігментів у листках *Trapa natans* у фазі вегетативного росту.

Fig. 2. The content of photosynthetic pigments in *Trapa natans* leaves on the phase of vegetative growth.

Використані джерела

- ГАВРИЛЕНКО В.Ф., ЛАДЫГИНА М.Е., ХАНДОБИНА Л.М. 1975. Большой практикум по физиологии растений. Высш. шк., Москва.
- ГАМАЛЕЙ Ю.В. и КУЛИКОВ Г.В. 1978. Развитие хлоренхимы листа. Наука, Ленинград.
- ГОРЫШИНА Е.Л. 1989. Фотосинтетический аппарат растений и условия среды. Изд-во ЛГУ, Ленинград.
- ЗАУРАЛОВА Н.О. 1980. Содержание пластидных пигментов в надводных и подводных листьях некоторых видов пресноводных гетерофильных растений. *Вестник ЛГУ. Сер. биол.* 5: 42–45.
- НЕДУХА О.М. 2004. Структурна характеристика та аналіз пігментів водної форми *Sium latifolium* L. Укр. ботан. журн. 61: 74–85.
- НЕКРАСОВА Г.Ф., РОНЖИНА Д.А., КОРОБИЦЫНА Е.Б. 1998. Формирование фотосинтетического аппарата в период роста погруженного, плавающего и надводного листа гидрофитов. *Физиол. раст.* 45: 539–548.
- НЕКРАСОВА Г.Ф., РОНЖИНА Д.А., МАЛЕВА М.Г., ПЬЯНКОВ В.И. 2003. Фотосинтетический метаболизм и активность карбоксилирующих ферментов у надводных, плавающих и погруженных листьев гидрофитов. *Физиол. раст.* 50: 65–75.
- BRAY E.A., BAILEY-SERRES J., VERETINIK E. 2001. Responses to abiotic stresses. In: BUCHNAN B., GRUISSEM W., JONES R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plant.*: 1158–1203. Amer. Soc. of Plant Physiology. Rockville, Maryland.
- NEDUKHA O.M. 2010. Epidermis leaf structural responses to some aquatic plants to constant water environment. *Adv. of Agricultural Sci. (Warsaw). Problem issue* 545: 169–178.
- RYEN F.J. 1985. Isolation and characterization of photosynthetically active cells from submerged and floating leaves of the aquatic macrophyte *Potamogeton nodosus* Poir. *Plant and Cell Physiol.* 26: 309–315.
- SAND-JENSEN K. & FROST-CHRISTENSEN H. 1999. Plant growth and photosynthesis in the transition zone between land and stream. *Aquat. Bot.* 63: 23–35.
- YANG J.P., DENGLER N.G., HORTON R.F. 1987. Heterophylly in *Ranunculus flabellaris*: The effect of abscisic acid on leaf anatomy. *Ann. Bot.* 60: 117–125.
- YANG J.P., DENGLER N.G., DONNELLY P.M., DICKINSON T.A. 1990. Heterophylly in *Ranunculus flabellaris*: The effect of abscisic acid on leaf ultrastructure. *Ann. Bot.* 65: 603–615.

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTIC OF CELLS AND PIGMENT ANALYSIS IN FLOATING AND SUBMERGED LEAVES OF *TRAPA NATANS* L.

OLENA M. NEDUKHA

Abstract. The comparative analysis of ultrastructure of the photosynthetic cells and pigment content of *Trapa natans* in both floating and submerged leaves at vegetative phase were conducted. It has shown that the changes of cell ultrastructure and pigment content in leaves are depended from the location of leaves above or under water surface. It has ascertained that submersion of the leaves under water lead to: 1) increase of thylakoid number in grana; 2) decrease of number of the chloroplasts with starch grains; 3) decrease of the relation between chlorophylls (Chla / Chlb) and of the sum of chlorophylls (Chla + Chlb) in comparison with analogical parameters in floating leaves.

Key words: leaf, cell ultrastructure, photosynthetic pigments, *Trapa natans*

M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS Ukraine. Tereshchenkivska str. 2, Kiev, 01601, Ukraine; o.nedukha@hotmail.com