

С. В. ТАГЕЕВА, Х. А. АБДУЛЛАЕВ, Э. М. ШВИРСТ

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МОРФОМЕТРИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН НА ПРИМЕРЕ ЛАМЕЛЛЯРНЫХ СТРУКТУР ХЛОРОПЛАСТОВ

(Представлено академиком Г. М. Франком 2 XI 1970)

В нашем исследовании была поставлена задача разрешения корреляционных отношений компонентов структурной организации ламелл хлоропластов, где хлорофилл наряду с липопротеидным комплексом составляет основу фотосинтетических мембран.

Известно, что скопление тилакоидов в стопки при образовании гран наблюдается только в присутствии хлорофилла и коррелирует с его интенсивным синтезом (¹⁻⁵). Однако в существующей литературе вопрос о соответствии содержания пигментов и степени развития ламеллярных структур в хлоропластах все еще полностью не решен.

С целью обнаружения взаимосвязи между количеством пигментов и мембранных структур в хлоропластах некоторых мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyehn, мы использовали современную методику количественной электронномикроскопической морфометрии (⁶).

Методика количественного анализа заключалась в следующем: при помощи специального устройства — линейного интегратора, разработанного в Институте биологической физики АН СССР (⁷), получали морфометрические характеристики компонентов ультраструктуры хлоропластов — матрикса, ламелл, осmioфильных глобул и крахмальных зерен.

Далее рассчитывали процентные соотношения парциальных полей компонентов по принципам стереологии (^{8,9}). Содержание пигментов определяли спектрофотометрически после извлечения пигментов смесью этанола и ацетона, используя формулы, предложенные Веттштейном (¹⁰).

Для целей электронномикроскопических исследований брали листочки у растений в фазе бутонизации. На этой стадии развития у мутантов четко выражена неравномерная окраска листьев. Кусочки ткани листьев фиксировались в 2,5% растворе глутаральдегида в фосфатном буфере при pH 7,4, дофиксировали 1% OsO₄. Материал обезвоживали спиртом возрастающей концентрации до абсолютного. После этого дополнительно проводили обезвоживание материала в безводном ацетоне. Объект заливали эпоном 812. Полученные срезы на ультрамикротоме OmU2 (Reihert) окрашивали по Рейнольдсу и просматривали на электронном микроскопе УЭМВ-100 в.

В работе (¹¹) получены данные о фенотипических различиях хлоропластов мутантных и контрольных растений. Как показало наше исследование, ультраструктура хлоропластов исходной расы (контроля) типична для хлоропластов других зеленых растений в норме. Имеются многочисленные грани, соединенные межгранными ламеллами, с крахмальными зернами и мелкозернистым плотным матриксом (рис. 1А). У мутанта виридоальбина 40/3 в зеленовато-желтой части листа встречаются хлоропласты с ненормальной ассоциацией тилакоидов в виде концентрически собранных мембран, напоминающие миелоноподобные структуры, с большим числом осmioфильных глобул (рис. 1Б). В бесцветной части листа этого мутанта

в клетках мезофилла имеются пластиды, сильно вакуолизированные, со скоплением мелких осmioфильных глобул, и совершенно лишённые мембранных структур с плотным матриксом (рис. 1Г). У мутанта пятнистого в зеленых тканях листа в мезофилле хлоропласты хорошо развиты и мало чем отличаются от хлоропластов контрольных растений. В них имеются большие крахмальные зерна, заполняющие большую часть объема хлоропласта, вакуоли и мелкие осmioфильные глобулы, которые в хлоропластах контрольных растений не наблюдаются (рис. 1В).

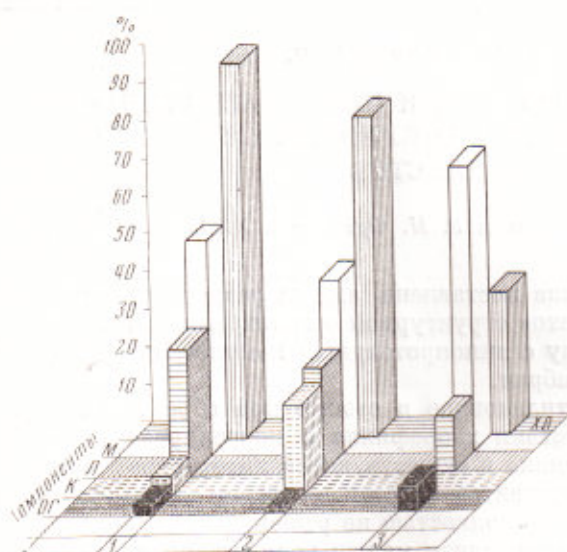


Рис. 2. Парциальные объемы компонентов структур хлоропластов и содержание хлорофилла в листьях. 1 — контроль, 2 — мутант пятнистый, 3 — мутант виридоальбина. м — матрикс, л — ламеллы, к — крахмал, о, с — осmioфильные глобулы, сл — хлорофилл

самую малую величину, а самую большую — матрикс. Самому малому парциальному объему ламелл (у виридоальбина 40/3) соответствует и самый малый показатель содержания пигментов. Если выразить парциальные объемы ламеллярных структур и количества хлорофилла в листьях мутантных форм в процентах от соответствующих показателей контроля, то получается следующий ряд цифр: контроль 100%; пятнистый мутант: а) объем ламелл 82%, б) количество хлорофилла 77%; мутант виридоальбина 40/3: а) объем ламелл 35%, б) количество хлорофилла 38%.

Располагая количественными данными по основным структурным компонентам хлоропласта — ламеллам, с одной стороны, и пигментными характеристиками мутантов, с другой, мы провели оценку степени корреляционной взаимосвязи между этими двумя показателями.

Вычисление коэффициентов корреляции двумя совершенно независимыми методами указывает на существование тесной взаимосвязи между объемом ламелл и содержанием зеленых пигментов. Коэффициент корреляции $r = 0,81 \pm 0,24$, коэффициент ранговой корреляции $\rho = 0,83 \pm 0,12$. Характер взаимосвязи между содержанием пигментов и объемом ламелл представлен на рис. 3 в форме линейной регрессии.

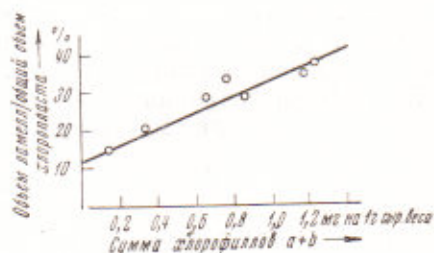


Рис. 3. Зависимость объема ламелл от содержания хлорофилла. $r = 0,81 \pm 0,24$, $y = 12 + 22x$

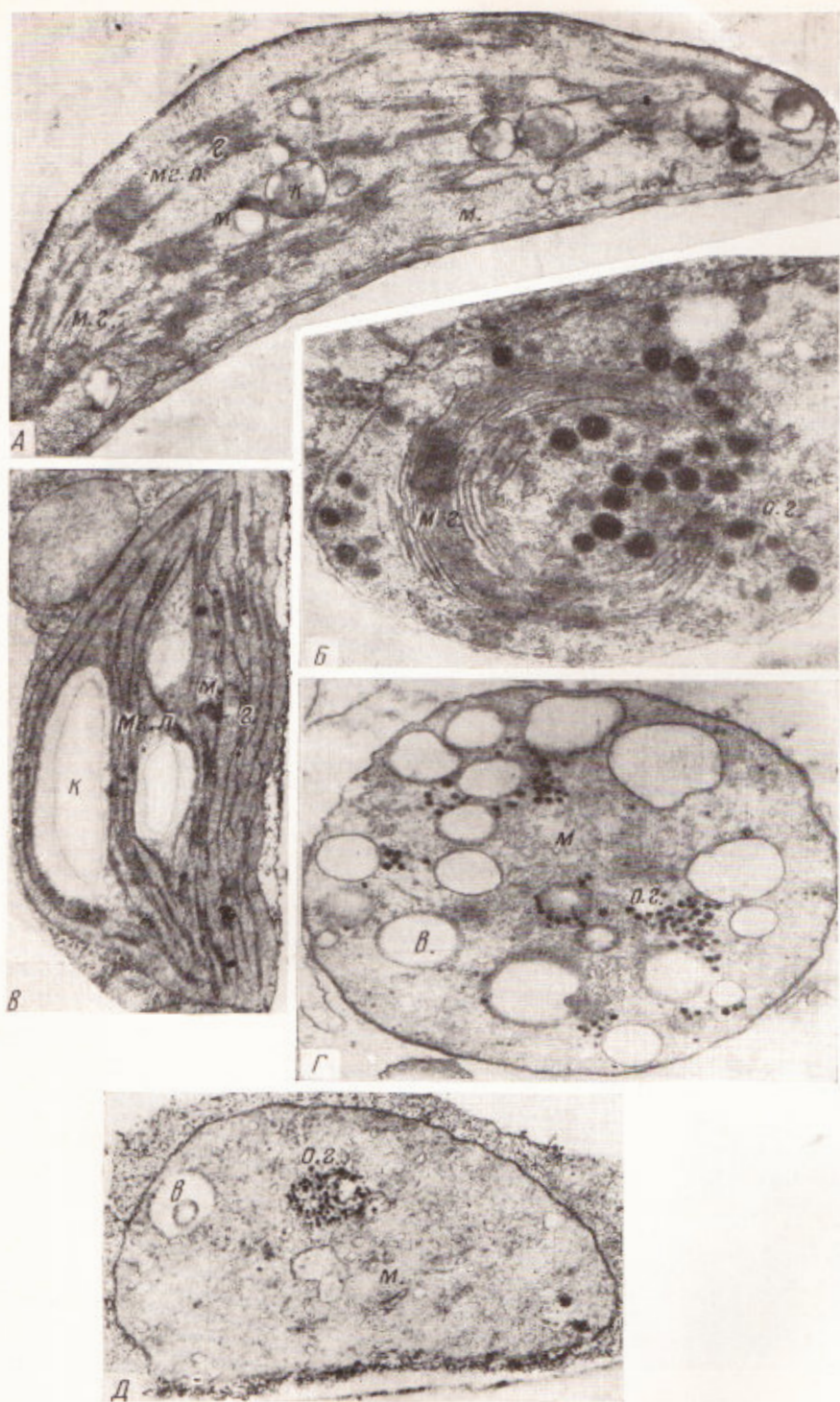


Рис. 1. Электронномикроскопические фотографии пластид розеточных листьев *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyehn. А — нормальный хлоропласт контрольного растения, 25 000 $\times$, Б — мутантное растение — виридоальбин, 32 000 $\times$, зелено-желтая ткань листа — пластида типа хлоропласта и бесцветная ткань листа — пластида типа лейкопласта (Г); В — пятиlobный мутант, 30 000 $\times$, зеленая ткань листа — пластида типа хлоропласта и бесцветная ткань листа — пластида типа лейкопласта (Д), м — матрикс, г — граны, о.г. — гигантская грана, м.г.л. — межграницные ламеллы, к — крахмал, в — вакуоли, о.г. — осмиофильные глобулы, м.г. — макрограна

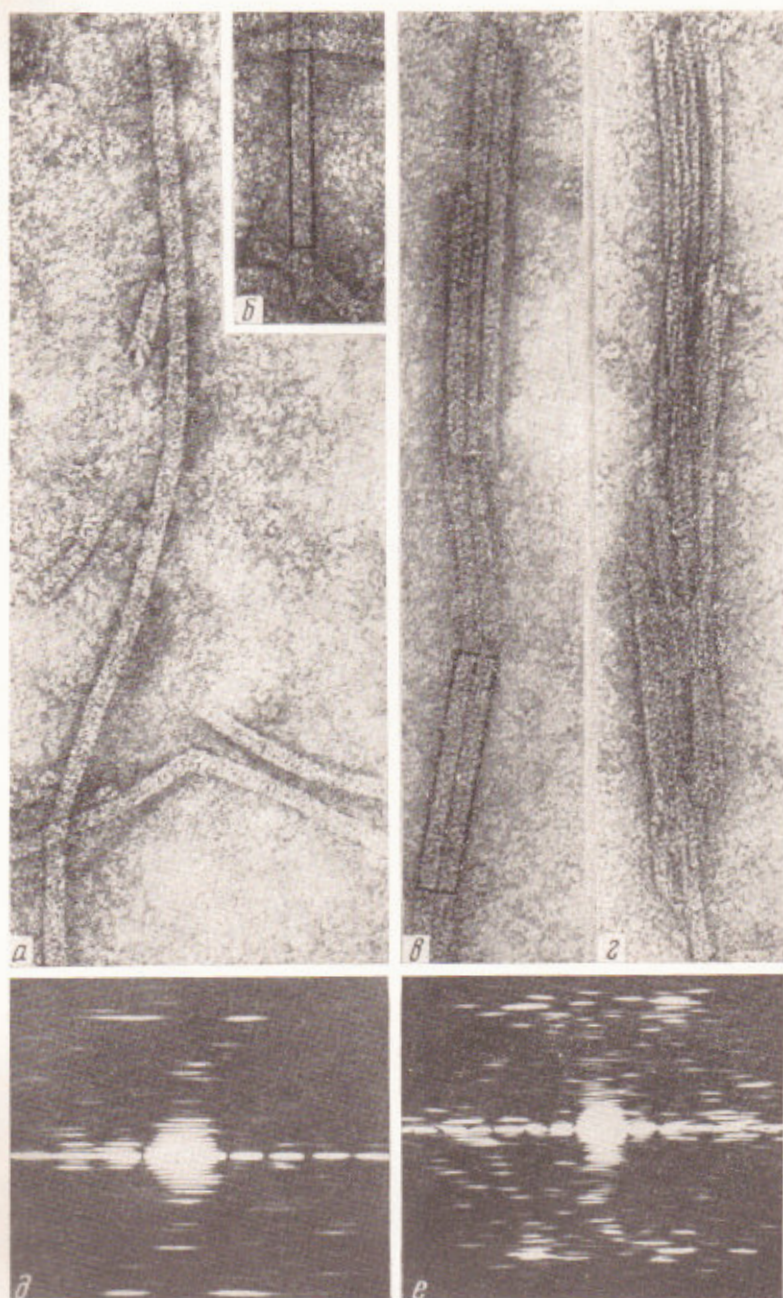


Рис. 1. а, б, в, г — палочкообразные частицы, образовавшиеся в результате полимеризации фермента. Рамкой очерчены частицы, с которых снята оптическая дифракция. Контрастирование 6% уранилацетатом. д — оптическая дифракционная картина, снятая с частицы, изображенной на б, и снятая с двух частиц в (е). Рефлексы дифракционных картин соответствуют $1/40 \text{ \AA}$ и $1/490 \text{ \AA}$

Таким образом, путем сопоставления количественных данных по ультраструктуре и содержанию пигментов в хлоропластах нами обнаружена прямая связь между степенью развития тилакоидной системы и концентрацией пигментов, т. е. парциальные объемы ламелл прямо пропорциональны содержанию фотосинтетических пигментов.

Проведенное нами исследование на количественной основе еще раз подтверждает мнение о том, что хлорофилл является одним из основных организующих компонентов ламеллярных структур хлоропластов. Кроме того, из наших данных следует, что примененный нами морфометрический метод позволил точно установить количественную связь между парциальным объемом мембранных систем хлоропластов и количеством входящего в их структуры хлорофилла. Отсюда вытекает принципиально важный вывод о том, что молекулярная структура мембран тилакоидов хлоропластов как контрольных, так и мутантных форм основывается на едином принципе организации ⁽¹²⁾.

Наши данные подтверждают положение ⁽¹³⁾ о том, что между содержанием пигментов и ламеллярными структурами существует принцип обратной связи, т. е. для образования ламеллярных структур необходимо присутствие хлорофилла, в свою очередь для синтеза хлорофилла необходимо определенное количество ламелл.

Институт биологической физики
Академия наук СССР
Пущино-на-Оке

Поступило
28 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Сейджер, В сборн. Структура и функция фотосинтетического аппарата, ИЛ, 1962. ² D. von Wettstein, *Canad. J. Bot.*, 39, 1537 (1961). ³ D. von Wettstein, *J. Ultrastructure Res.*, 3, 324 (1959). ⁴ D. von Wettstein, G. Eriksson, *Genetics Today*, 3, 591 (1965). ⁵ G. Röbbelen, *Planta*, 69, 1 (1966). ⁶ E. K. Weibel, *Quantitative Methods in Morphology*, 1967, p. 89. ⁷ Э. М. Швирст, В кн.: Современные проблемы машинного анализа биологических структур, «Наука», 1970. ⁸ E. K. Weibel, H. Elias, *Quantitative Methods in Morphology*, 1967, p. 3. ⁹ F. R. Weibel, *Intern. Rev. of Cytol.*, 26, 235 (1969). ¹⁰ D. von Wettstein, *Exp. Cell. Res.*, 12, 427 (1957). ¹¹ X. А. Абдуллаев и др., Докл. АН ТаджССР, 13, 6 (1970). ¹² С. В. Тагеева, Особенности организации функциональных структур растений в связи с процессами жизнедеятельности, М., 1971. ¹³ К. Уоддингтон, Морфогенез и генетика, М., 1964.