



<http://dx.doi.org/10.15407/ukrbotj72.05.487>

О.М. КЛИМЕНКО

Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України

вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01004, Україна

li_grey@mail.ru

УЛЬТРАСТРУКТУРА ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ ТА ВМІСТ ПІГМЕНТІВ У ПЛАВАЮЧИХ І ПІДВОДНИХ ЛИСТКАХ *NUPHAR LUTEA* ТА *NYMPHAEA ALBA*

Клименко О.М. Ультраструктура фотосинтетичного апарату та вміст пігментів у плаваючих і підводних листках *Nuphar lutea* та *Nymphaea alba*. — Укр. ботан. журн. — 2015. — 72(5): 487—497.

Досліджено ультраструктуру та вміст пігментів плаваючих і підводних листків водних гетерофільних рослин *Nuphar lutea* (L.) Smith. і *Nymphaea alba* L. Показано значну відмінність ультраструктури плаваючих і підводних листків вказаних видів рослин: підводним листкам притаманні більший розмір хлоропластів, більша кількість тилакоїдів у грані, більший парціальний об'єм фотосинтетичних мембран. Виявлено різницю щодо вмісту пігментів у різних типах листків: найбільша концентрація хлорофілів і каротиноїдів на одиницю сухої ваги зафіксована у підводних листків. Зворотна тенденція спостерігається в розподіленні пігментів на одиницю площі листка. На підставі аналізу отриманих даних і літературних джерел стосовно пластичності фотосинтетичного апарату рослин запропоновано модель адаптації підводних листків до водного середовища.

Ключові слова: *Nuphar lutea*, *Nymphaea alba*, листок, гетерофілія, ультраструктура, пігменти

Вступ

Одним із механізмів адаптації рослин до певних умов навколишнього середовища є гетерофілія — формування на одній рослині різних за формою листків, що супроводжується змінами їх структурно-функціональної організації, починаючи з прямої поділу клітин і закінчуючи змінами на субклітинному та молекулярному рівнях (Kordyum, 1996; Kordyum et al., 2003). Ознаки гетерофілії найяскравіше проявляються у водних рослин, оскільки їхні органи або частини органів перебувають у контрастних умовах — повітряному та водному середовищах. Наприклад, *Nuphar lutea* (L.) Smith. та *Nymphaea alba* L. мають плаваючі та підводні листки, що формують розетку на дні водойми. Зі зниженням рівня води *N. lutea* створює суходільну форму «terrestris» або «minoriflore», *N. alba* не має такої життєвої форми (Dubyna, 1982). Гетерофілія надає водним рослинам перевагу в адаптації до умов зовнішнього середовища. Метою дослідження був порівняльний аналіз ультраструктури та складу пігментів різних типів листків *N. lutea*

та *N. alba* для з'ясування спільних рис щодо їхньої адаптації до умов зовнішнього середовища.

Об'єкти та методи досліджень

Для дослідження брали зрілі листки *N. lutea* та *N. alba*, які плавають на поверхні водойми, та підводні листки, що формують розетку на дні водойми глибиною 0,5 і 0,8 метра відповідно. З середньої третини листової пластинки вирізали ділянки мезофіту розміром 0,5 × 1 см. Фіксацію 2,5 %-вим глутаровим альдегідом та 1 %-вим OsO₄, зневоднення в серії спиртів і заливання зразків у суміш епоксидних смол (епон-аралдит) здійснювали за загальноприйнятим методом (Reynolds, 1963). Ультратонкі зрізи (50—70 нм) для трансмісійної електронної мікроскопії отримували на ультрамікроскопі MT-XL (RMC Instrument, США). Зрізи переносили на бленди з формваровою підложкою та контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю (Reynolds, 1963). Зразки досліджували в мікроскопах JEM 1200EX і JEM 1230EX (Jeol, Японія) та фотографували на фотоплівку Agfa Alliance Camera CE (Бельгія). Сканували негативи, використовуючи сканер Epson Perfection V700 Photo (Японія). Отримані цифрові зображення аналізували за допомо-

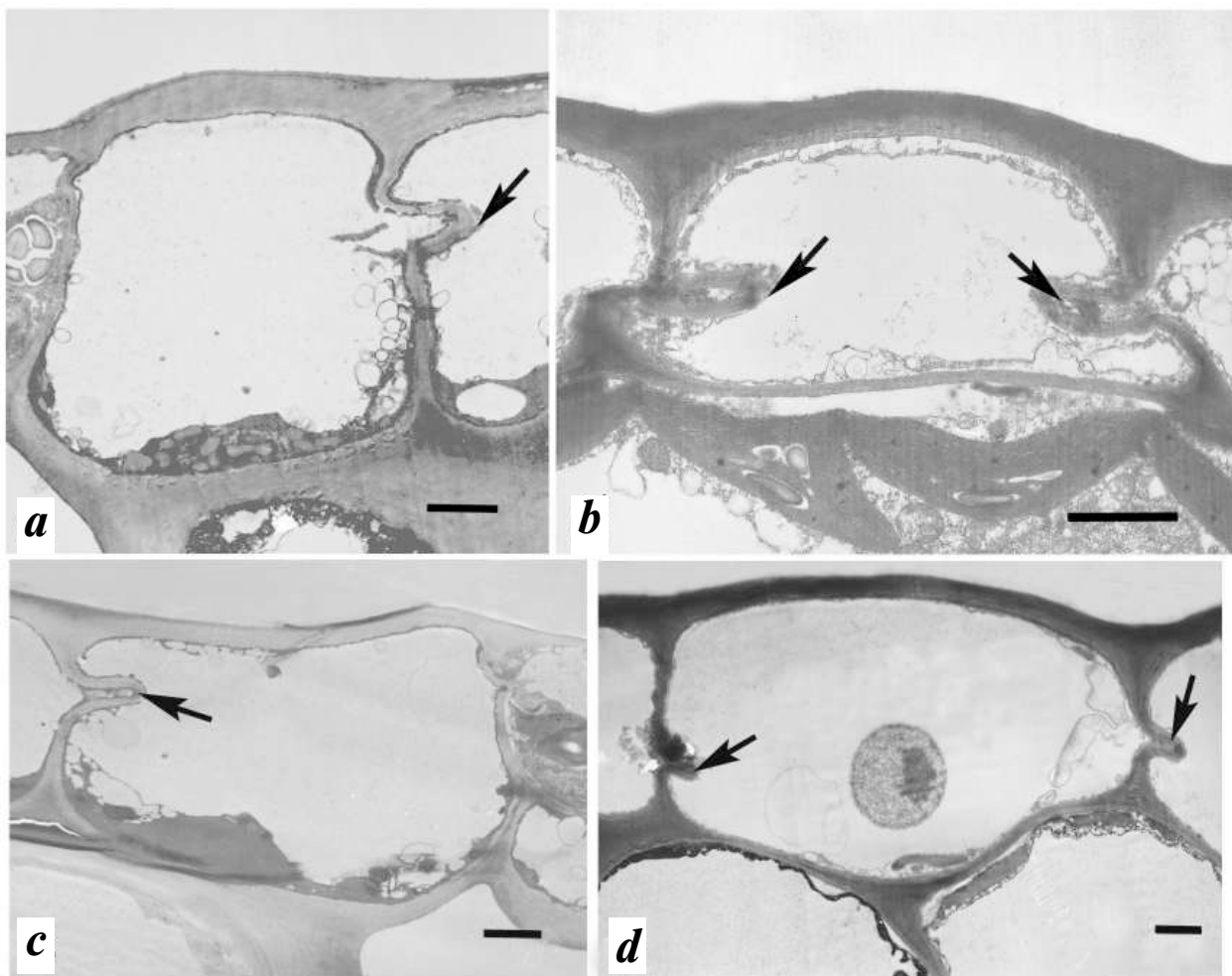


Рис. 1. Клітини верхнього епідермісу плаваючого (*a, c*) і підводного (*b, d*) листків *Nuphar lutea* та *Nymphaea alba*. Стрілками позначені вигини клітинної стінки, масштаб — 2 мкм

Fig. 1. Adaxial epidermis cells of floating (*a, c*) and submerged (*b, d*) leaves of *Nuphar lutea* and *Nymphaea alba*. Arrows indicate curve of cell wall, scale bar — 2 μ m

гою програми UTHSCSA Image Tool 3.0 (США). На фотографіях вимірювали лінійні розміри та площу хлоропластів, визначали кількість тилакоїдів у грані. Вимірювали по 50 органел на препаратах трьох листків кожного досліджуваного типу. Додатково розраховували об'єм і площу поверхні хлоропластів, парціальні й абсолютні об'єми фотосинтетичних мембран, строми хлоропластів (Silvaev, Silvaev, 1979).

Для визначення вмісту пігментів висічки з листків (150 мг) гомогенізували з додаванням 85 % розчину ацетону. Гомогенізатор центрифугували впродовж 10 хв за 5000 обертів за хвилину. Надосадову рідину вимірювали на спектрофотометрі Specord M40 (Німеччина) за довжини хвиль 663,2, 646,8 і

470 нм. Вміст хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів перераховували на грам сухої маси й одиницю площі (cm^2) листка за формулами Ліхтенталера та Бушмана (Lichtenthaler, Buschmann, 2000). Паралельно з екстрагуванням пігментів ідентичні наважки з трьох листків кожного типу (150 мг) використовували для визначення сухої маси. Дані обробляли за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office 2007 (Excel 7). Усі отримані числові значення тестували щодо нормальності розподілу значень у вибірці. Достовірну різницю між незалежними вибірками даних визначали за критерієм Стьюдента ($p \leq 5\%$) за нормальним розподілом і критерієм Манна-Уїтні (*U-test*) ($p \leq 5\%$) у разі розподілу, що відрізнявся від нормального.

Результати досліджень та їх обговорення

Плаваючим листкам *N. lutea* та *N. alba* притаманний дорзовентральний тип мезофілу, що диференційований на палісадну паренхіму, яка має 4—8 шарів циліндричних клітин, і губчасту паренхіму, утворену з тонкостінних овальних клітин і великих міжклітинників (аеренхіми). У підводних листках досліджуваних рослин гомогенний тип мезофілу складається з 6—8 шарів клітин недиференційованого мезофілу, наявні невеликі міжклітинники (Kordyum, Klimentko, 2013; Klymenko, 2014). Ультраструктура клітин епідермісу плаваючих і підводних листків *N. lutea* та *N. alba* подібна: ядро округлої форми розташовується біля внутрішньої тангентальної стінки клітини, велика вакуоля заповнена розрідженим осміофільним вмістом і займає центральне положення, зрідка фіксуються 1—3 хлоропласти на зріз клітини (рис. 1). Пластиди містять слабзорозвинені грани, пластоглобули, великі крохмальні зерна. Мітохондрії з добре розвиненою системою крист й інтрамітохондріальними гранулами. Ендоплазматичний ретикулум та апарат Гольджі нерозвинені. Між клітинною оболонкою та плазмалею спостерігаються везикули, трапляються ліпідні краплі. Клітини епідермісу вкриті шаром кутикули та додатково у плаваючих листків — шаром воску. Їхні зовнішні клітинні стінки потовщені порівняно з антиклінальними. Особливістю антиклінальних стінок клітин епідермісу всіх типів листків досліджуваних рослин є утворення петлеподібних вигинів (рис. 1), формування яких описане лише у підводних листків багатьох водних рослин, наприклад, *Batrachium eradicatedum* (Laest.) Fries., *Batrachium peltatum* (Schrank.) C. Presl., *Halophila minor* (Zoll.) Hartog, *Hyrilla verticillata* (L.f.) Royle, *Zostera marina* L. Припускається, що

вигини клітин епідермісу пов'язані з умовами підводного існування. Петлеподібні вигини збільшують поверхню обміну клітини з апопластом, сприяють розширенню контакту з водним середовищем й інтенсифікації процесів поглинання (наприклад, бікарбонатів) або виділення речовин (Milashvili, Gamaley, 1985). На нижній поверхні плаваючих і підводних листків розташовані гідропоти — чашоподібні, підняті над епідермісом залозки.

Ультраструктура клітин мезофілу плаваючих листків досліджуваних рослин типова для фотосинтезуючих клітин: клітини містять велику центральну вакуолю, ядро видовженої або округлої форми. У *N. lutea* гранулярний ендоплазматичний ретикулум представлений численними вузькими цистернами, тоді як у *N. alba* він нерозвинений. У цитоплазмі клітин палісадної паренхіми *N. alba* наявні ліпідні краплі. В обох видів зрідка трапляються периплазматичні тільця та в деяких клітинах вакуоля заповнена осміофільним вмістом. Мітохондрії клітин палісадної паренхіми обох видів мають розвинену систему крист. Популяція мітохондрій поліморфна: спостерігаються органели округлої, овальної та видовженої форм. Мітохондрії містять інтрамітохондріальні гранули, мають здебільшого ортодоксальну конфігурацію з вузькими кристами та просвітленим матриксом, але зрідка фіксуються органели конденсованої конфігурації, площа варіює в межах 0,16—2,06 мкм² у *N. lutea* та 0,10—0,65 мкм² — у *N. alba*. Максимальна кількість мітохондрій, які контактують із хлоропластами, — 5. Хлоропласти лінзоподібної форми розташовуються вздовж антиклінальних стінок (рис. 2, a, b), їхня довжина та ширина в досліджуваних видів не мають статистично достовірної різниці, як і об'єм хлоропласта та площа поверхні (табл. 1).

Таблиця 1. Морфометричні показники ультраструктури хлоропластів *Nuphar lutea* та *Nymphaea alba*

Вид	Листки	Шар мезофілу	Довжина хлоропласта, мкм	Ширина хлоропласта, мкм	Об'єм хлоропласта, мкм ³	Площа поверхні хлоропласта, мкм ²	Кількість тилакоїдів на грану
<i>N. lutea</i>	Плаваючі	Палісадна паренхіма	4,46±0,22 ^a	1,32±0,09 ^a	10,79±1,03 ^a	35,79±2,70 ^a	2,63±0,12 ^a
<i>N. alba</i>			4,31±0,17 ^a	1,16±0,04 ^a	10,69±1,11 ^a	34,97±2,61 ^a	2,08±0,05 ^b
<i>N. lutea</i>	Підводні	Верхній	5,26±0,19 ^b	1,22±0,04 ^a	15,47±1,66 ^b	48,38±2,52 ^b	8,30±0,57 ^c
		Нижній	5,21±0,16 ^b	1,22±0,05 ^a	14,79±1,19 ^b	48,28±2,69 ^b	8,82±0,66 ^c
<i>N. alba</i>	Підводні	Верхній	5,52±0,20 ^b	1,12±0,05 ^a	17,40±2,22 ^b	54,97±4,24 ^b	12,94±0,93 ^d
		Нижній	5,34±0,16 ^b	1,06±0,03 ^b	13,10±1,08 ^b	49,17±2,98 ^b	11,27±0,77 ^d

Примітка: значення параметрів (M±m) у колонках з однаковими літерами у верхньому регістрі не мають достовірної різниці при P ≤ 0,05, n = 50.

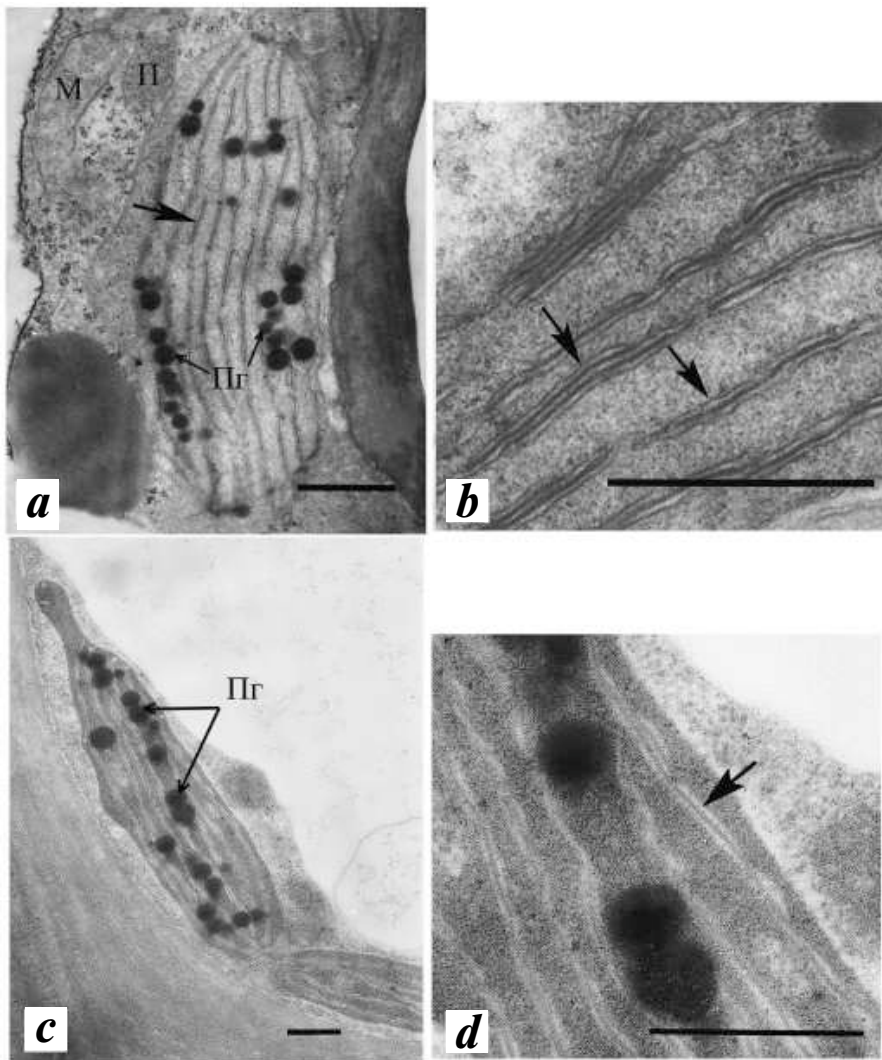


Рис. 2. Фрагмент клітини палисадної паренхіми плаваючого листка *Nuphar lutea* (a, b) і *Nymphaea alba* (c, d); a, c — загальний вигляд хлоропласта, b, d — фрагменти хлоропласта. М — мітохондрія, П — пероксисома, Пг — пластоглобули. Стрілками позначені грани. Масштаб — 500 нм

Fig. 2. The fragments of the palisade parenchyma cells of floating leaves of *Nuphar lutea* (a, b) and *Nymphaea alba* (c, d); a, c — chloroplast, b, d — chloroplast fragment. М — mitochondrion, П — peroxisome, Пг — plastoglobuli. Arrows indicate grana. Scale bar — 500 nm

Грани хлоропластів плаваючих листків *N. lutea* нараховують 2–8 тилакоїдів і 2–3 тилакоїди у *N. alba* (рис. 2, b, d). У *N. lutea* переважає фракція гран, де від 2 до 5 (96,2 %) тилакоїдів, фракція гран з більшою їх кількістю (від 6 до 11) сягає відповідно 3,8 %, тоді як у *N. alba* грани, в яких більше трьох тилакоїдів, не виявлені, тобто фракція гран з 2–5 тилакоїдами становить 100 %. Між значеннями парціального об'єму фотосинтетичних мембран і строми хлоропластів немає достовірної різниці, відмінності між видами спостерігаються лише в об'ємі гранальних тилакоїдів — у *N. alba* їхній парціальний об'єм менший за такий у *N. lutea* (табл. 2). Трапляються грани з розширеними тилакоїдами. Практично в усіх пластидах досліджуваних видів наявні пластоглобули (2–30 на зріз хлоропласта).

У *N. alba* поодинокі хлоропласти мають стромули (рис. 2, c).

Клітини губчастої паренхіми плаваючих листків досліджуваних видів містять велику центральну вакуолю, ядро видовженої форми, хлоропласти розташовані вздовж всієї клітинної поверхні, в них спостерігаються крохмальні зерна. Зрідка трапляються конденсовані мітохондрії.

Клітини недиференційованого мезофілу підводних листків *N. lutea* і *N. alba* мають видовжене ядро, велику центральну вакуолю, яка в деяких клітинах заповнена осміофільним аморфним вмістом. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум незрозвинений. Спостерігається велика кількість периплазматичних тілець. Мітохондрії округлої та овальної форм, ортодоксальної конфігурації, з просвітленим матриксом із вузькими кристами,

Таблиця 2. Фотосинтетичні мембрани хлоропластів *Nuphar lutea* та *Nymphaea alba*

Вид	Листки	Шар мезофілу	Парціальний об'єм, %			
			Фотосинтетичні мембрани	Гранальні тилакоїди	Міжгранні тилакоїди	Строма
<i>N. lutea</i>	Плаваючі	Палісадна паренхіма	18,19±1,66 ^a	14,88±1,81 ^a	4,32±0,70 ^a	76,91±1,90 ^a
<i>N. alba</i>			13,85±0,90 ^a	9,20±0,75 ^b	4,66±0,36 ^a	81,23±1,30 ^a
<i>N. lutea</i>	Підводні	Верхній	49,65±2,70 ^b	42,13±2,66 ^c	7,52±0,56 ^b	46,70±2,58 ^b
		Нижній	47,62±2,89 ^b	41,07±1,40 ^c	6,55±1,50 ^b	52,48±2,84 ^c
<i>N. alba</i>		Верхній	55,89±4,99 ^b	51,45±7,64 ^c	4,44±0,53 ^a	42,28±8,07 ^b
		Нижній	55,72±2,00 ^b	48,34±1,37 ^c	7,23±0,48 ^b	46,32±2,00 ^b

Примітка: значення параметрів ($M \pm m$) у колонках з однаковими літерами у верхньому регістрі не мають достовірної різниці при $P \leq 0,05$, $n = 50$.

іноді з інтрамітохондріальними гранулами. Площа органел *N. lutea* варіює в межах 0,12—1,03 μm^2 , у *N. alba* — 0,08—0,66 μm^2 . З хлоропластами контактують до 6 мітохондрій у клітинах *N. lutea* та не більше 2 мітохондрій — у *N. alba*. Хлоропласти лінзоподібної форми розташовуються вздовж периклінальних стінок клітин. Їхні довжина та ширина, об'єм і площа поверхні в клітинах верхнього та нижнього шарів недиференційованого мезофілу *N. lutea* і *N. alba* не мають статистично достовірної різниці (табл. 1). Система гран хлоропластів добре розвинена: грани клітин верхнього шару мезофілу *N. lutea* нараховують 2—25 тилакоїдів, нижнього — 2—41, тоді як ці показники в *N. alba* становлять 3—59 та 2—44 тилакоїди відповідно (рис. 3, c, d). У верхньому шарі мезофілу *N. lutea* переважає фракція гран, де (2—5) (44 %) тилакоїдів, у нижньому — від 6 до 10 (36,8 %), середня кількість тилакоїдів на грану — $8,3 \pm 0,57$ і $8,82 \pm 0,66$ відповідно та не має статистично достовірної різниці (табл. 1). У хлоропластах *N. alba*, незалежно від шару мезофілу, переважає фракція гран, в яких від 6 до 10 (35,5 %) тилакоїдів у верхньому та 32 % — у нижньому, середня кількість тилакоїдів на грану становить $12,94 \pm 0,93$ і $11,27 \pm 0,77$ відповідно (табл. 1). У гранах хлоропластів *N. alba* зафіксована більша максимальна та середня кількість тилакоїдів порівняно з *N. lutea*. Значення парціального об'єму фотосинтетичних мембран і гранальних тилакоїдів хлоропластів клітин мезофілу досліджуваних видів не має статистично достовірної різниці. Відмінності між видами виявлені лише в об'ємі міжгранних тилакоїдів — у *N. alba* в хлоропластах клітин верхнього мезофілу їхній парціальний об'єм менший за такий у *N. lutea* (табл. 2). У хлоропластах досліджуваних видів наявні пластоглобули — поодинокі у *N. lutea* та численніші — у *N. alba* (від 1 до 23), також спостерігаються поодинокі крохмальні зерна (рис. 3, a, b).

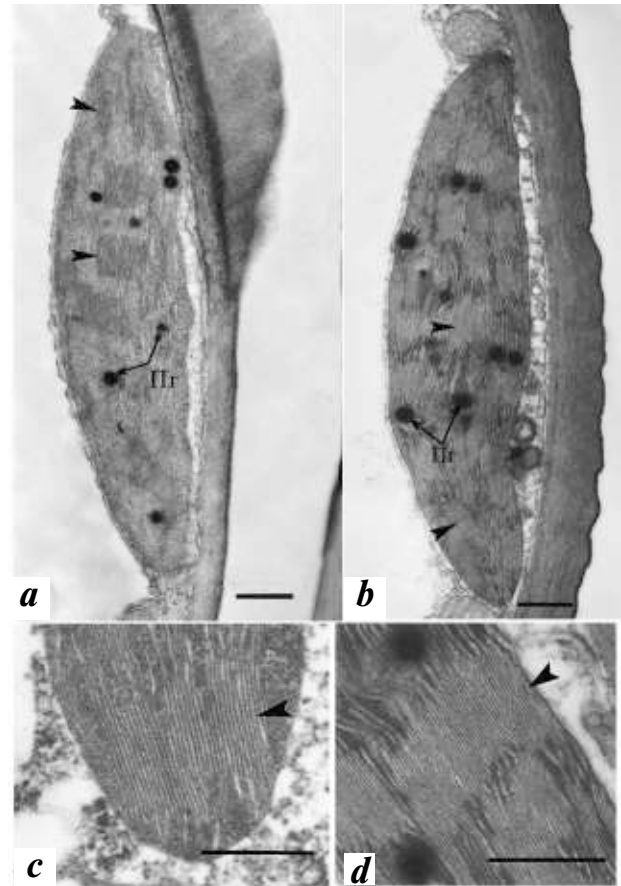


Рис. 3. Фрагмент клітини мезофілу підводного листка *Nuphar lutea* (a, b) і *Nymphaea alba* (c, d); a, b — загальний вигляд хлоропласта, c, d — фрагменти хлоропласта. Пг — пластоглобули. Стрілками позначені грани, масштаб — 500 нм

Fig. 3. The fragments of the mesophyll cells of submerged leaves of *Nuphar lutea* (a, b) and *Nymphaea alba* (c, d); a, b — chloroplast, c, d — chloroplast fragment. Пг — plastoglobuli. Arrowheads indicate grana, scale bar — 500 nm

Таким чином, ультраструктура клітин палісадної паренхіми плаваючих листків *N. lutea* і *N. alba* та недиференційованого мезофілу їхніх підводних листків значно відрізняється. Хлоропласти підводних листків, розташовані вздовж периклінальних стінок клітини, мають достовірно більші лінійні розміри, містять грани з більшою (в 4—6 разів) кількістю тилакоїдів, мають утричі—вчетверо більший парціальний об'єм фотосинтетичних мембран, слаборозвинений гранулярний ендоплазматичний ретикулум, велику кількість периплазматичних тілець. Розташування хлоропластів уздовж периклінальних стінок клітин мезофілу характерне для підводних листків водних рослин. Наприклад, у водної гетерофільної рослини *Ranunculus flabellaris* Raf. хлоропласти підводних листків містяться вздовж периклінальних стінок клітин мезофілу (Young et al., 1990). Припускається, що таке розміщення хлоропластів обумовлене не тільки низькою інтенсивністю світла, яка притаманна водному середовищу, а й доступністю CO₂; орієнтація хлоропластів підводних листків уздовж периклінальних стінок засвідчує, що діоксид вуглецю потрапляє в них з води крізь епідерміс, при цьому кутикула стає основною перешкодою для його дифузії (Olesen, Madsen, 2000; Mommer, Visser, 2005).

Хлоропласти підводних листків *N. lutea* та *N. alba* мають більші розміри, ніж хлоропласти плаваючих листків. За лінійними розмірами пластиди цих рослин наближаються до пластид, притаманних тіншовитривалим рослинам. Така закономірність виявлена й щодо інших водних гетерофільних рослин, наприклад, *Hippus vulgaris* L. і *Sium latifolium* L. Хлоропласти підводних листків цих рослин мають достовірно більші лінійні розміри, площу поверхні та об'єм (Zauralova, 1980). Ще однією рисою, яка зближує підводні листки з листками тіншовитривалих рослин, є велика кількість тилакоїдів у грані. Хлоропласти, де в грані 6—20, а в окремих випадках — до 40 та більше тилакоїдів, описані в підводних листках *R. flabellaris*, *S. latifolium* і в досліджуваних нами рослин *N. lutea* та *N. alba* (Young et al., 1990; Nedukha, 2011). Типовість низьких гран з 2—5 тилакоїдами для хлоропластів листків світлолюбних рослин і високих — для хлоропластів тіншовитривалих рослин є широковідомим фактом (Goodchild et al., 1972).

Особливості тилакоїдної системи у світлолюбних і тіншовитривалих видів — це генетично обумовлені ознаки виду або роду, тоді як різниця струк-

тури тилакоїдної системи «світлових» і «тіншових» листків є фенотипічною за своїм походженням і виникає як адаптація у відповідь на зміну умов навколишнього середовища (інтенсивності освітлення, температури, рН та інших факторів) (Gamaleyi, Kylikov, 1978). Адаптивні реакції листків можуть бути як біохімічними, так і анатомічними. Однак зрілі, повністю розвинуті листки обмежені щодо зміни морфології й анатомії, тому їхня адаптація до світла різної інтенсивності відбувається на біохімічному (регулювання реакцій карбоксилювання, швидкості електронного транспорту тощо) та ультраструктурному (зміна просторової орієнтації хлоропластів і їхньої структури) рівнях (Ojangurena, Goulden, 2013).

У хлоропластах підводних листків спостерігалися грани з розширеними, тобто набряклими тилакоїдами. Відомо, що до набряку тилакоїдів призводить широке коло фізичних і хімічних чинників: зміна рН середовища, накопичення в люмені тилакоїда іонів K⁺ (так зване осмотичне набрякання), перебування рослини протягом тривалого періоду в темряві, засолення, вплив хімічних речовин різної природи, наприклад, нітратів, сульфідів (Pearcy, Franceschp, 1986; Benamina, 1999). Ще однією особливістю ультраструктури клітин підводних листків *N. lutea* та *N. alba*, порівняно з плаваючими, є велика кількість периплазматичних тілець. Така особливість притаманна й листкам *R. flabellaris*. Вважається, що ці тільца беруть участь у транспорті розчинених речовин (Young et al., 1990).

В ультраструктурі фотосинтетичного апарату різних шарів мезофілу підводних листків *N. lutea* та *N. alba* відмінностей у лінійних розмірах хлоропластів, об'ємі, площі поверхні та парціальному об'ємі фотосинтетичних мембран не виявлено. Лише у хлоропластах нижнього шару мезофілу *N. lutea* спостерігається дещо більший об'єм строми (табл. 2).

Отже, в ультраструктурі клітин мезофілу плаваючих і підводних листків зафіксовано відмінності на рівні ультраструктури фотосинтетичного апарату, що, в свою чергу, призводить до різного перебігу фізіологічних процесів — фотосинтезу та дихання.

Вміст хлорофілу *a*, *b*, суми хлорофілів (*a+b*) і каротиноїдів на одиницю сухої маси (мг/г) достовірно вищий у підводних листках *N. lutea* та *N. alba* порівняно з плаваючими (табл. 3). У розподілі пігментів на одиницю площі листка (мг/см²) спос-

Таблиця 3. Вміст пігментів у листках *Nuphar lutea* та *Nymphaea alba* (мг/г сухої маси)

Пігменти	<i>N. lutea</i>	<i>N. alba</i>	<i>N. lutea</i>	<i>N. alba</i>
	Тип листків			
	плаваючі листки		підводні листки	
Хлорофіл <i>a</i>	3,99±0,58 ^a	2,81±0,23 ^a	8,03±0,32 ^b	5,46±0,63 ^c
Хлорофіл <i>b</i>	1,42±0,21 ^a	0,85±0,06 ^b	3,26±0,18 ^c	3,18±0,61 ^c
Хлорофіли (<i>a+b</i>)	5,41±0,79 ^a	3,66±0,27 ^b	11,29±0,44 ^c	8,08±0,92 ^d
Каротиноїди	1,27±0,13 ^a	0,87±0,07 ^b	2,51±0,14 ^c	1,88±0,26 ^c
Хлорофіл <i>a/b</i>	2,81±0,07 ^a	3,30±0,21 ^b	2,49±0,11 ^a	2,12±0,10 ^c
Хлорофіл/ Каротиноїди	4,18±0,20 ^a	4,23±0,27 ^a	4,54±0,16 ^a	5,17±0,41 ^b

Примітка: між значеннями параметрів у рядках з однаковими літерами у верхньому регістрі немає достовірної різниці при $P \leq 0,05$, $n = 10$.

Таблиця 4. Вміст пігментів у листках *Nuphar lutea* та *Nymphaea alba* (мкг/см² листка)

Пігменти	<i>N. lutea</i>	<i>N. alba</i>	<i>N. lutea</i>	<i>N. alba</i>
	Тип листків			
	плаваючі листки		підводні листки	
Хлорофіл <i>a</i>	21,95±0,78 ^a	30,05±2,65 ^b	5,56±0,33 ^c	11,57±2,67 ^d
Хлорофіл <i>b</i>	7,87±0,53 ^a	9,83±0,88 ^a	2,29±0,23 ^b	5,44±1,15 ^c
Хлорофіл (<i>a+b</i>)	29,82±1,45 ^a	37,33±4,27 ^b	7,84±0,54 ^c	17,47±3,49 ^d
Каротиноїди	7,48±0,37 ^a	10,08±0,98 ^b	1,72±0,09 ^c	3,17±0,51 ^d

Примітка: між значеннями параметрів у рядках з однаковими літерами у верхньому регістрі немає достовірної різниці при $P \leq 0,05$, $n = 10$.

терігається зворотна закономірність: найбільша кількість хлорофілів *a* та *b* і каротиноїдів притаманна плаваючим листкам, а найменша — підводним (табл. 4). Співвідношення хлорофілів *a/b* становить 2,81±0,07 у плаваючих і 2,49±0,11 — у підводних листків *N. lutea*. Значення цього показника у *N. alba* — 3,30±0,21 у плаваючих листків і 2,12±0,10 — у підводних (різниця достовірна). Аналогічна тенденція виявлена і щодо співвідношення хлорофілів до каротиноїдів (табл. 3).

Невелику кількість хлорофілів *a*, *b* і їхній сумарний вміст (*a+b*) на одиницю сухої маси плаваючих листків *N. lutea* та *N. alba* (табл. 3) пов'язують з їх існуванням за умов високої освітленості. У рослин, які адаптовані до великої інтенсивності світла, порівняно незначна кількість хлорофілу в листках забезпечує нормальну життєдіяльність і зменшує загрозу фотоушкодження клітини. Дослідження Ронжиної та співавторів показали, що середні значення вмісту хлорофілу на мг/г сухої маси плаваючих листків водних гетерофільних рослин становлять 7,62±0,62, підводних — 13,80±0,89, повітряних — 9,09±1,20 (Ronzhyna et al., 2004). Хоча в деяких водних рослин спостерігається протилежний розподіл фотосинтетичних пігментів: наприклад, у водної рослини *Littorella uniflora* (L.) Aschers. сумарний вміст хлорофілів (*a+b*) на оди-

ницю сухої маси в 1,5 раза вищий у надводних листках (6,35±1,05 мг/г) порівняно з підводними (4,26±0,05 мг/г) (Ronzhyna et al., 2004). У водних рослин *Myosotis scorpioides* L. і *Ranunculus trichophyllus* Chaix ex Vill. не виявлено достовірної різниці між вмістом хлорофілів (*a+b*) у повітряних і підводних листках. Ці види зростають у водоймах з невеликою глибиною, де інтенсивність світла не відрізняється від освітлення на суходолі. Тому припускається, що вони не виробили пристосувань, які характерні для різних типів листків повітряно-водних рослин (Germ, Gaberščik, 2003).

Для плаваючих листків, як і для листків наземних рослин, зміна вмісту пігментів у розрахунку на одиницю маси є наслідком зміни співвідношення фотосинтезуючих і нефотосинтезуючих тканин (Ronzhyna et al., 2004). Раніше ми показали, що парціальний об'єм міжклітинників плаваючих листків *N. lutea* становить 43,48±0,41 %, а листків *N. alba* — 69±1,03 %. Виходячи з цих даних, можна пояснити менший вміст хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів у листках *N. alba* (Kordyum, Klimentenko, 2013; Klimentenko, 2014). Підводні листки досліджуваних рослин мають вищу концентрацію фотосинтетичних пігментів на одиницю сухої маси (мг/г) порівняно з плаваючими листками. При цьому слід відзначити вищий вміст хлорофілу *a* та більшу суму

хлорофілів ($a+b$) у підводних листків *N. lutea* порівняно з підводними листками *N. alba*, що складно пояснити змінами в анатомії листків (Клуменко, 2015). Відомо, що за низької інтенсивності світла зі збільшенням глибини зростання, замутиності води або певної зміни спектрального складу світла зменшується співвідношення хлорофілів a/b . Наприклад, у підводних листках *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle з переважанням зеленого та червоного світла знижується співвідношення хлорофілів a/b (1,95 і 2,02 відповідно) порівняно з блакитним і білим світлом (2,22 і 2,27 відповідно) (Van et al., 1977). Зменшення значення співвідношення хлорофілів a/b відображає збільшення частки хлорофілу b , який повністю зосереджений у головному світлозбиральному комплексі фотосистеми II (СЗКІІ) і може розглядатись як збільшення антенного комплексу фотосистеми II (Lichtenthaler et al., 1981). Однак кількість хлорофілу b у мг/г сухої маси підводних листків *N. lutea* і *N. alba* статистично достовірно не відрізняється (табл. 3). До певної міри більшу кількість хлорофілу a у підводних листках *N. lutea* можна вважати видоспецифічною ознакою.

Вміст каротиноїдів на одиницю сухої маси у підводних листках досліджуваних рослин статистично достовірно вищий, аніж у плаваючих (табл. 3). Вважається, що висока концентрація каротиноїдів у пігментному комплексі підводних листків обумовлена тим, що вони виконують функцію додаткових світлозбиральних пігментів і забезпечують поглинання світла в синьо-зеленій частині спектра (350—500 нм). Це дає змогу рослині ефективніше використовувати фотосинтетично активну радіацію у водному середовищі. У плаваючих листків, які зростають на яскравому світлі, каротиноїди виконують фотопротекторну функцію: захищають фотосинтетичний апарат від активних форм кисню (Grumbach, 1984). Важливою характеристикою пігментного комплексу є співвідношення хлорофілів і каротиноїдів, яке в різних видів рослин коливається в широких межах (від 2 до 7) (Ророва et al., 1984). Листкам *N. lutea* та *N. alba* різних типів притаманне доволі високе співвідношення хлорофілів до каротиноїдів: від 4,18 до 5,17 (табл. 3). Вважається, що співвідношення хлорофілів a/b та хлорофілів і каротиноїдів відображає саме пристосування окремого хлоропласта до змін світла, а сумарний вміст

пігментів на одиницю маси або площі залежить від анатомії листка (Wentworth et al., 2004). У підводних листків процес фотосинтезу інтенсивніший завдяки збільшенню ефективності поглинання світла (Ronzhyna et al., 2004), яка, в свою чергу, залежить від вмісту хлорофілу на одиницю площі: чим він вищий, тим більша частка поглинутого світла.

Як уже зазначалося, в розподілі пігментів на одиницю площі листка (мг/см²) у *N. lutea* та *N. alba* спостерігається зворотна закономірність: найбільша кількість хлорофілів і каротиноїдів притаманна плаваючим листкам, а найменша — підводним. Така сама тенденція простежується і в інших водних гетерофільних рослин. Наприклад, вміст пігментів у різних типах листків *Sagittaria sagittifolia* L. зростав у ряду підводні→плаваючі→повітряні: вміст хлорофілу a підвищувався з $0,85 \pm 0,14$ до $3,42 \pm 0,87$ мг/дм², хлорофілу b — з $0,30 \pm 0,03$ до $1,96 \pm 0,66$ мг/дм², каротиноїдів — від $0,30 \pm 0,06$ до $0,93 \pm 0,18$ мг/дм² (Klančnik et al., 2011). Отже, менший вміст хлорофілу на одиницю площі (мг/см²) у підводних листках *N. lutea* та *N. alba* порівняно з плаваючими обумовлений особливостями анатомічної будови: підводні листки мають значно тоншу пластинку з меншою кількістю шарів клітин мезофілу, в яких спостерігається небагато хлоропластів. Тимчасом окремі хлоропласти підводних листків можуть містити більше фотосинтезуючих пігментів, аніж пластиди плаваючих: у підводних листків зростають лінійні розміри хлоропласта та, відповідно, вміст пігментів в окремій пластиді. Отже, різницю щодо вмісту пігментів у досліджуваних видів можна пояснити особливостями анатомії їхніх листків: плаваючі та підводні листки *N. alba* мають більшу товщину та кількість шарів клітин мезофілу, що й зумовлює вищий вміст пігментів на одиницю площі порівняно з листками *N. lutea*.

За аналізом одержаних даних і літературних відомостей щодо пластичності фотосинтетичного апарату рослин ми пропонуємо модель адаптації підводних листків до існування у водному середовищі, яке відрізняється від повітряного за інтенсивністю та спектральним складом світла (рис. 4). Це зниження ефективності роботи фотосинтетичного електрон-транспортного ланцюга та збільшення вмісту пігментів на одиницю сухої маси листка, що корелює зі зміною ультраструктури хлоропластів — збільшенням кількості тилакоїдів у грані, розта-

шуванням хлоропластів уздовж периклінальних стінок клітин мезофілу й епідермісу, наявністю мезофілу гомогенного типу. Запропонована модель адаптації підводних листків водних рослин подібна до такої листків тіньовитривалих рослин. Інші автори виявили, що в листків, які затінені, змінюються функціональні показники, насамперед вміст фотосинтетичних пігментів: він зростає в окремому хлоропласті, але зменшується у перерахунку на одиницю сухої маси листка. Це відбувається за рахунок зміни як ультраструктури хлоропластів, так і анатомічної будови листків тіньовитривалих рослин порівняно зі світлолюбними: клітини мезофілу містять менше хлоропластів, але це компенсується їхніми більшими лінійними розмірами та великою кількістю тилакоїдів у грані. Вважається, що формування гран із численними тилакоїдами забезпечує більше світлозбиральних антен для поліпшення вловлювання розсіяного світла, адже кількість молекул пігменту на реакційний центр у них така ж, як і в світлолюбних рослин (Anderson, 1979; Marschall, Proctor, 2004; Momokawa et al., 2011). Отже, фенотипічна пластичність фотосинтетичного апарату забезпечує адаптацію рослин, зокрема гетерофільних водних рослин, до флуктуацій інтенсивності та спектрального складу світла.

Висновки

На основі проведених досліджень ультраструктури фотосинтезуючих клітин, зокрема хлоропластів, плаваючих і підводних листків *N. lutea* та *N. alba* та вмісту фотосинтетичних пігментів (хлорофілів і каротиноїдів), виявлено значні відмінності між цими типами листків в обох вивчених видів. Ультраструктура хлоропластів клітин мезофілу підводних листків чітко відрізняється від хлоропластів плаваючих листків більшими лінійними розмірами, збільшеною кількістю тилакоїдів у грані, зростанням парціального об'єму фотосинтетичних мембран та вмісту фотосинтетичних пігментів на одиницю сухої маси. Щодо розподілу пігментів на одиницю площі листка, навпаки, спостерігається зворотна закономірність: найбільший вміст пігментів виявлений у плаваючих листків, що обумовлено особливостями анатомічної будови різних типів листків. Припускається, що якісні та кількісні зміни вмісту пігментів підводних листків мають компенсаторний характер і зводяться до збільшення світлозбиральної здатності фотосинтетичного апарату

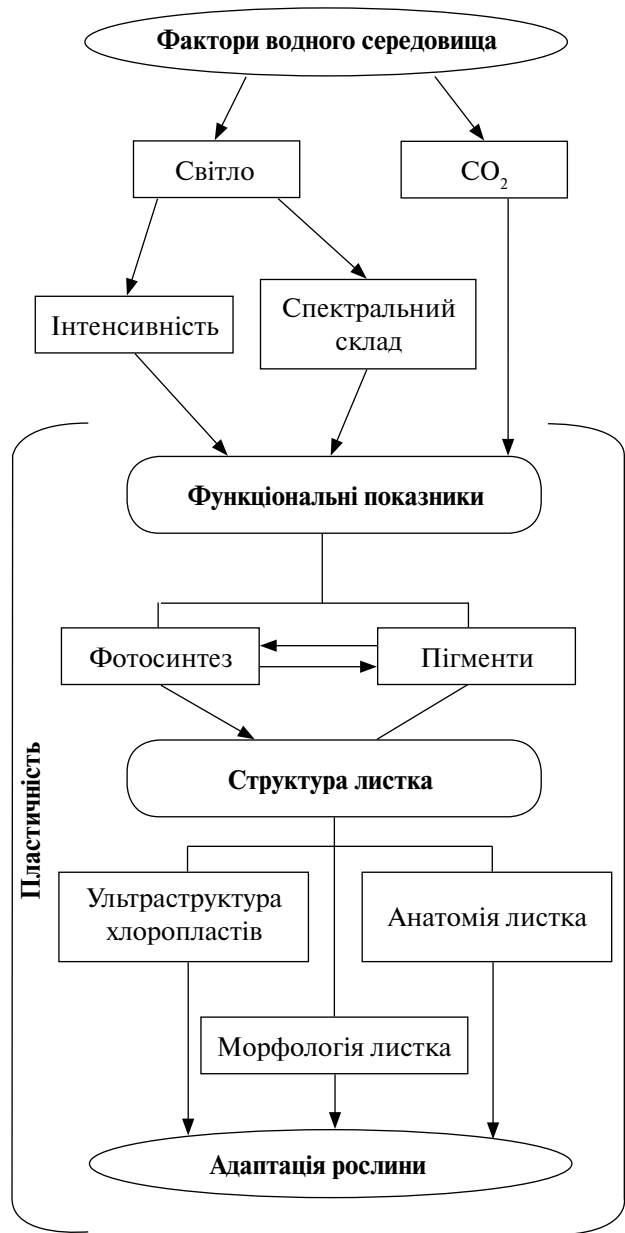


Рис. 4. Модель адаптації підводних листків до водного середовища

Fig. 4. Model of adaptation of the submerged leaves to water environment

рослин в умовах зменшення інтенсивності та зміни спектрального складу світла, що проходить крізь товщу води. Запропоновано модель адаптації підводних листків до існування у водному середовищі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anderson I.M., Goodchild D.I., Boardman N.K. Composition of the photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants, *Biochim. Biophys.*, 1973, **325**, pp. 573–585.
- Benamina K.J., Walker D.I., McComba A.J. Structural response of marine and estuarine plants of *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. to long-term hyposalinity, *Aquat. Bot.*, 1999, **64**, pp. 1–17.
- Dubyna D.V. *Kuvshinkovye Ukrainy*, Kiev: Naukova Dumka, 1982, 230 p. [Дубына Д.В. *Кувшинковые Украины*. — Киев: Наук. думка, 1982. — 230 с.]
- Gamaleyi U.I., Kylikov G.V. *Razvitie khlorenchimy lista*, Leningrad: Nauka, 1978, 192 p. [Гамалей Ю.И., Куликов Г.В. *Развитие хлоренхимы листа*. — Л.: Наука, 1978. — 192 с.]
- Germ M., Gaberščik A. Comparison of aerial and submerged leaves in two amphibious species, *Myosotis scorpioides* and *Ranunculus trichophyllus*, *Photosynthetica*, 2003, **41**(1), pp. 91–96.
- Goodchild D.J., Björkman O., Pylotis N.A. Chloroplast ultrastructure, leaf anatomy, and content of chlorophyll and soluble protein in rainforest species, *Carnegie Inst. Ann. Rept. Dir. Dep. Plant Biol.*, 1972, pp. 102–107.
- Grumbach K. Biosynthesis of carotenoids and quinones in higher plants and their participation in photosynthesis. In: *Structure, function and metabolism of plant lipids*. P.-A. Siegenthaler, W. Eichenberg., Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 1984, pp. 245–257.
- Klančnik K., Mlinar M., Gaberščik A. Heterophylly results in a variety of «spectral signatures» in aquatic plant species, *Aquat. Bot.*, 2011, **98**, pp. 20–26.
- Klymenko O.M., *Anatomiya plavayuchykh ta pidvodnykh lystkiv heterofilnoi roslyny Nymphaea candida L.* In: *Materialy 3 mizhnar. nauk. konf. z morfolohii roslyn «Suchasna fitomorfologiya»*. Lviv, 2014, pp. 327–330 [Клименко О.М. *Анатомія плаваючих та підводних листків гетерофільної рослини Nymphaea candida L.: мат.-ли 3-ї міжнар. наук. конф. з морфології рослин «Сучасна фітоморфологія»*. — Львів, 2014. — Т. 6. — С. 327–330].
- Klymenko O.M. Morphology and anatomy features of leaves of heterophyllous plants *Nuphar lutea* (L.) Smith. and *Nymphaea alba* L. In: *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*, part 1, 2015, pp. 345–348.
- Kordyum E.L. Sovremennye problemy kletchnoy biologii rasteniy. In: *Botanika i mikologiya na puti v tretie tysyacheletie*. Ed. S.P. Wasser, Kyiv: Naukova Dumka., 1996, pp. 245–255 [Кордюм Е.Л. Современные проблемы клеточной биологии растений // *Ботаника и микология на пути в третье тысячелетие* / Ред. С.П. Вассер. — Киев: Наук. думка, 1996. — С. 245–255].
- Kordyum E.L., Sytnik K.M., Baranenko V.V. *Kletochnye mekhanizmy adaptatsii rasteniy*, Kiev: Naukova Dumka, 2003, 229 p. [Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. *Клеточные механизмы адаптации растений*. — Киев: Наук. думка, 2003. — 229 с.]
- Kordyum E.L., Klimenko E.N. Chloroplast ultrastructure and chlorophyll performance in the leaves of heterophyllous *Nuphar lutea* (L.) Smith. *Plants, Aquat. bot.*, 2013, **110**, pp. 84–91.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Doll M. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves, *Photosynth. Res.*, 1981, **2**, pp. 115–141.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-vis spectroscopy. In: *Current protocols in food analytical chemistry*. Ed. R.E. Wrolstad, Canada: John Wiley & Sons Inc., 2000, pp. 171–179.
- Marschall M., Proctor M. C.F. Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids, *Ann. Bot.*, 2004, **94**, pp. 593–603.
- Milashvili T.P., Gamaleyi U.V. *Tsitologia*, 1985, **27**(5), pp. 511–517 [Милашвили Т.П., Гамалей Ю.В. Особенности пластидного аппарата подводных и надводных листьев двух видов водного лютика // *Цитология*. — 1985. — **27**(5). — С. 511–517].
- Mommer L., Visser E. Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity, *Ann. Bot.*, 2005, **96**(4), pp. 581–589.
- Momokawa N., Kadono Y., Kudoh H. Effects of light quality on leaf morphogenesis of a heterophyllous amphibious plant, *Rotala hippuris*, *Ann. Bot.*, 2011, **108**, pp. 1299–1306.
- Nedukha O.M. *Heterophylly of plants*, Kyiv: Alterpress, 2011, 192 p. [Недуха О.М. *Гетерофілія у рослин*. — К.: Альтерпрес, 2011. — 192 с.]
- Ojangurena C.T., Goulden M.L. Photosynthetic acclimation within individual *Typha latifolia* leaf segments, *Aquat. bot.*, 2013, **111**, pp. 54–61.
- Olesen B., Madsen T.V. Growth and physiological acclimation to temperature and inorganic carbon availability by two submerged aquatic macrophyte species, *Callitriche cophocarpa* and *Elodea canadensis*, *Funct. Ecol.*, 2000, **14**, pp. 252–260.
- Pearcy R.W., Franceschp V.R. Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of C₃ and C₄ tree species grown in high- and low-light environments, *Photosynth. Res.*, 1986, **9**, pp. 317–331.
- Popova O.F., Slemnev N.N., Popova I.A. *Botan. zhurn.*, 1984, **69**, pp. 334–344 [Попова О.Ф., Слемнев Н.Н., Попова И.А. Содержание пигментов пластид у растений пустынь Гоби и Каракумы // *Ботан. журн.* — 1984. — **69**. — С. 334–344].

- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electronmicroscopy, *J. Cell Biol.*, 1963, **17**, pp. 208—212.
- Ronzhyna D.A., Nekrasova G.V., Piankov V.I. *Fiziol. rast.*, 2004, **51**(1), pp. 27—34 [Ронжина Д.А., Некрасова Г.Ф., Пьянков В.И. Сравнительная характеристика пигментного комплекса надводных, плавающих и погруженных листьев гидрофитов // *Физиол. раст.* — 2004. — **51**(1). — С. 27—34].
- Silaeva A.M., Silaev A.V. *Fiziol. biokh. kelt. rast.*, 1979, **6**, pp. 547—562 [Силаева А.М., Силаев А.В. Методы качественного анализа электронно-микроскопических изображений хлоропластов // *Физиол. биох. культ. раст.* — 1979. — **6**. — С. 547—562].
- Van T.K., Hailer W.T., Bowes G., Garrard L.A. Effects of light quality on growth and chlorophyll composition in *Hydrilla*, *J. Aquat. Plant. Manag.*, 1977, **15**, pp. 29—31.
- Wentworth M., Murchie E.H., Gray J.E. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress II. Acclimation of photosynthesis, *J. Exper. Bot.*, 2006, **57**(3), pp. 699—709.
- Young J.P., Dengler N.G., Donnelly P.M. Heterophylly in *Ranunculus flabellaris*: the effect of abscisic acid on leaf ultrastructure, *Ann. Bot.*, 1990, **65**, pp. 603—615.
- Zauralova N.O. *Botan. zhurn.*, 1980, **65**(10), pp. 1439—1446 [Зауралова Н.О. Ассимиляционный аппарат некоторых видов пресноводных растений // *Ботан. журн.* — 1980. — **65**(10). — С. 1439—1446].

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 07.04.2015 р.

Клименко О.М. **Ультраструктура фотосинтетического аппарата и содержание пигментов плавающих и подводных листьев *Nuphar lutea* и *Nymphaea alba***. — 2015. — Укр. ботан. журн. — **72**(5): 487—497.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
ул. Терещенковская, 2, г. Киев, 01004, Украина

Исследованы ультраструктура и содержание пигментов плавающих и подводных листьев водных гетерофильных растений *Nuphar lutea* (L.) Smith. и *Nymphaea alba* L. Показано значительное отличие ультраструктуры плавающих и подводных листьев исследованных видов растений: для подводных листьев характерны больший размер хлоропластов, большее количество тилакоидов в гране, больший парциальный объем фотосинтетических мембран. Установлены отличия в содержании пигментов в разных типах листьев: наибольшая концентрация хлорофиллов и каротиноидов в единице сухой массы характерна для подводных листьев. Обратная тенденция наблюдается в распределении пигментов на единицу площади листа. На основе анализа полученных данных и литературных источников о пластичности фотосинтетического аппарата растений предложена модель адаптации подводных листьев к водной среде.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Nuphar lutea*, *Nymphaea alba*, лист, гетерофиллия, ультраструктура, пигменты.

Klymenko E.N. **Ultrastructure of photosynthetic apparatus and pigment content of floating and submerged leaves of *Nuphar lutea* and *Nymphaea alba***. — Ukr. Bot. J. — 2015. — **72**(5): 487—497.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, 01004, Ukraine

The leaf mesophyll cells ultrastructure and pigment content of heterophyllous aquatic plants *Nuphar lutea* (L.) Smith. and *Nymphaea alba* L. are reported. The ultrastructural differences of submerged and floating leaves were determined. Submerged leaf chloroplasts are located along the periclinal cell walls. They have significantly greater linear dimensions, contain grana with a large number of thylakoids, and have greater partial volume of photosynthetic membranes. The difference in the content of pigments in leaves was demonstrated: submerged leaves had the highest content of chlorophyll and carotenoids per unit of dry weight; floating leaves had the lowest one. The opposite trend was observed in the content of pigments per unit area. Based on the analysis of the obtained data and the literature data on the plasticity of the photosynthetic apparatus of plants, a model of underwater leaves adaptation to the aquatic environment was proposed.

К е y w o r d s : *Nuphar lutea*, *Nymphaea alba*, leaf, heterophylly, ultrastructure, pigments.