

УДК 582.751.42:581.456:633.854.54

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАСТИДНОГО АППАРАТА ХЛОРОФИЛЛЬНЫХ МУТАНТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Яранцева В.В., Лях В.А.

*Запорожский национальный университет
69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66*

VIKA.yaran@mail.ru

Изучена морфология пластидного аппарата мутантов льна масличного (*Linum humile* Mill.) с разным типом хлорофилльной недостаточности – *viridis*, *xantha* и *xantho-viridis* в сравнении с исходным сортом Циан. Выявлено, что хлорофилльные мутанты льна имеют измененный пластидный аппарат. Изменение линейных размеров и производных показателей (площади сечения и объема) хлоропластов зависит от типа мутации. Мутант типа *xantha* имеет цилиндрическую форму хлоропластов.

Ключевые слова: Linum humile Mill., хлорофилльный мутант, viridis, xantha, xanthoviridis, хлоропласт, морфология.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАСТИДНОГО АППАРАТУ ХЛОРОФІЛЬНИХ МУТАНТІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО

Яранцева В.В., Лях В.А.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

VIKA.yaran@mail.ru

Вивчена морфологія пластидного апарату мутантів льону олійного (*Linum humile* Mill.) з різним типом хлорофільних недостатності – *viridis*, *xantha* і *xantho-viridis* у порівнянні з вихідним сортом Циан. Виявлено, що хлорофільні мутанти льону мають змінений пластидний апарат. Зміна лінійних розмірів та похідних показників (площі перерізу та об'єму) хлоропластів залежить від типу мутації. Мутант типу *xantha* має циліндроподібну форму хлоропластів.

Ключові слова: Linum humile Mill., хлорофільний мутант, viridis, xantha, xanthoviridis, хлоропласт, морфологія.

CHARACTERISTIC PLASTID APPARATUS CHLOROPHYLL MUTANTS OF OIL FLAX

Yarantseva V.V., Lyakh V.A.

*Zaporizhzhya national university
69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky Street 6*

VIKA.yaran@mail.ru

Flax is important of technical and oilcrop in the world. Linseed oil is used in food, medicine, manufacturing oil-based paints, varnishes, linoleum, etc. The variety of areas of cultivation and uses of this crop required of the creation of various flax varieties with high photosynthetic activity for great yield formation.

Photosynthesis is an important process which ensures the growth and development of plants. The ability of plants to photosynthesize and its intensity depends primarily on the pigment composition, structural features of the photosynthetic apparatus, environmental factors, mineral nutrition, and others. The main organ of photosynthesis in higher plants is the leaf, and the features of its structure provide autotrophic type of food which is characteristic for the plant body. Chloroplasts with the contained pigments are the basic structural and functional unit of the photosynthetic apparatus.

For many years, the chlorophyll mutants that have significant morphological changes in color of plants are a convenient model for studying the processes of photosynthesis and structures that take a direct part in it. The intensity of photosynthesis in chlorophyll mutants is about 10 times lower than the rate of photosynthesis in green plants. Mutants flax produced in the course of research on experimental mutagenesis are very interesting subject for the study of physiological and biochemical aspects of photosynthesis.

The aim of this study was to investigate the differences in the structure of the plastid apparatus in mutants with different types of chlorophyll deficiency.

As a material, the variety Tsian and received at its base through induced mutagenesis mutant lines M-80, M-81 and M-84, characterized by different types of chlorophyll deficiency were used.

Tsian is a variety of linseed. The plant is green, medium-leaved, leaves are broadly lanceolate.

Mutant line M-80 was obtained by irradiating the seeds of variety Tsian using the dose of 400 Gy. Cotyledon leaves are light yellow, with the growth of the plant it is green, but its color is different from the normal green. This chlorophyll change applies to *viridis* type.

Mutant line M-81 was isolated from a variety Tsian by irradiation dose of 400 Gy. Plants of this line have a characteristic white-yellow color. With the growth bright yellow pigmentation fades and the plants before the end of the growing season, have the traits of severe depression. Mutation is related to the type of *xantha*.

Plants of the mutant line M-84, obtained by irradiation dose of 700 Gy, have a distinctive dirty-yellow color of the leaves. Mutation is related to the type of *xantho-viridis*.

To study the plastid morphology, the selected leaves were fixed in a Temper mixture containing 0.2% of copper chloride, 0.2% of copper nitrate, and 1% of phenol, which allows to keep the coloring of the chloroplasts. Then the leaves were waxed, cross-sections were prepared using MPS-2 rotary microtome and dewaxing was conducted. For this, glass tvilh glued cross sections were washed in three changes of xylol, two changes of 100% alcohol, a change of 75% alcohol, a 50% alcohol and three changes of distilled water. The time of each treatment was about 2 – 3 minutes. Then the sections were put into glycerol and covered with cover glasses. The resultant preparations were photographed using XS-3330 microscope trinocular and MA88-500 eyepiece cameras at magnification of $\times 640$ and $\times 1600$ times. The dimensions of chloroplasts were measured by standard methods using the ocular micrometer. To characterize the plastid apparatus cross-sectional area and volume of chloroplasts was calculated using the procedure of A.T. Mokronosov.

The results were processed using standard methods of mathematical statistics.

Mutant lines M-80, M-81 and M-84 are characterized by different expression of negative chlorophyll changes – *viridis*, *xantha* and *xantho-viridis*, respectively. By the time of the study (at the stage of «Horring bone») the plants both had chlorophyll part and green part. In this case, the localization of chlorophyll area (upper, middle or lower part) on the plant depended on the type of mutation. As control the variety Tsian with normal green color of leaves was used.

As seen from Table 1, the chloroplasts of mutant lines in both length and width, in the most cases were significantly different from variety Tsian. There was a decrease in their linear dimensions.

Chlorophyll mutants of linseed were also characterized changes by the in the shape of chloroplasts. Thus, chloroplasts of mutant M-81 (*xantha*) were much narrower than the control. On the basis of the ratio of length and width chloroplast in the mutant M-81 it was found that its chloroplasts have the shape of the cylinder. The chloroplasts in mutant M-84 (*xantho-viridis*) size were not significantly different from the control, but had a spindle-like shape (Figure 2). The chloroplasts of the mutant M-80 (*viridis*) by the shape does not differ from the control, but have a smaller size.

The cross-sectional area and volume of chloroplasts was also calculated. As seen in Figure 3, cross-sectional area of chloroplasts most reduced in the mutant M-80 (1.7 times). Mutant M-81 is characterized by the maximum decreasing in volume of the chloroplasts among the mutants (2.4-fold). It should be noted that the mutant M-84 is characterized by the smallest reduction of cross-sectional area and volume of chloroplasts – 1.3 and 1.5 times, respectively.

It was revealed that the chlorophyll mutants of linseed have a modified plastid apparatus. Change in linear dimensions of chloroplasts depends on the type of mutation. The mutants *xantha* and *xantho-viridis* types change the shape of the chloroplasts. The mutant of *xantha* type has chloroplasts of cylinder-like shape. The mutant of *xantho-viridis* type is characterized by the lowest changes of indirect parameters of chloroplasts.

Key words: Linum humile Mill., chlorophyll mutant, viridis, xantha, xanthoviridis, chloroplast, morphology.

ВВЕДЕНИЕ

Лен – важная в мире техническая и масличная культура. Льняное масло используется в питании, медицине, производстве масляных красок, олифы, линолеума и т.д. Многообразие зон выращивания и направлений использования культуры обуславливает необходимость создания различных сортов льна с высокими показателями фотосинтетической активности для формирования большого урожая [1, 2].

Фотосинтез является важнейшим процессом в обеспечении роста и развития растений. Способность растений к фотосинтезу и его интенсивность зависят прежде всего от пигментного состава, особенностей строения фотосинтетического аппарата, экологических факторов, минерального питания и др. Во время эволюции у растений сформировались специфические структуры, обеспечивающие процессы фотосинтеза, приводящие в конечном итоге к связыванию углекислоты, выделению кислорода и синтезу сахаров. Главным органом фотосинтеза у высших растений является лист, а особенности его строения

обеспечивают автотрофный тип питания, характерный для растительного организма. Хлоропласты с содержащимися в них пигментами являются основной структурно-функциональной единицей фотосинтетического аппарата [3-5].

В течение многих лет удобной моделью для изучения процессов фотосинтеза и структур, которые принимают в нём непосредственное участие, являются хлорофилльные мутанты, которые имеют значительные морфологические изменения окраски растений. Установлено, что интенсивность фотосинтеза у хлорофилльных мутантов приблизительно в 10 раз ниже интенсивности фотосинтеза зеленых растений. Интересным объектом для изучения физиолого-биохимических аспектов фотосинтеза являются мутанты льна, полученные в ходе исследований по экспериментальному мутагенезу [6].

При использовании индуцированного мутагенеза у ряда генотипов льна масличного (*Linum humile* Mill.) нами была выделена серия мутаций с различными типами минус-хлорофилльных изменений. Данные мутации имеют различное морфологическое проявление на одних и тех же стадиях развития [7, 8].

Целью настоящей работы было выявить различия в строении пластидного аппарата у мутантов с разным типом хлорофилльной недостаточности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала использовали линейный сорт льна масличного Циан и полученные на его основе с помощью индуцированного мутагенеза мутантные линии М-80, М-81 и М-84, характеризующиеся разным типом хлорофилльной недостаточности.

Циан – сорт льна масличного, межеумок. Растение зеленое, средне-облиственное, листья широко-ланцетные, лепестки венчика, пыльники и жилки голубые, поверхность лепестков гладкая, цветок открытый. Имеет высокое содержание масла. Сорт широко и весьма успешно культивируют в разных климатических зонах, что указывает на исключительную пластичность культуры.

Мутантная линия М-80 получена при облучении семян сорта Циан дозой 400 Гр. Семядольные листья светло-желтые, по мере роста растение зеленеет, однако его окраска отличается от нормальной зеленой. На стадии «елочки» верхняя часть растения имеет светло-желтую окраску, а нижняя – светло-зеленую. Данное хлорофилльное изменение относится к типу *viridis* (рис.1 б).

Мутантная линия М-81 выделена из сорта Циан при облучении дозой 400 Гр. Растения данной линии имеют характерную бело-желтую окраску. По мере роста ярко-желтая пигментация тускнеет и растения доживают до конца вегетации, сохраняя признаки сильной угнетенности и отставания в росте. На стадии «елочки» верхняя часть растения имеет ярко-жёлтую окраску листьев, в средней части листья становятся более тусклыми и зеленеют в области проводящих пучков, а в нижней – имеют светло-зелёную окраску. Мутант сохраняет такую характеристику при любых погодных условиях. Семенная продуктивность растений низкая. Мутация отнесена к типу *xantha* (рис.1 в).

Растения мутантной линии М-84, полученные при облучении дозой 700 Гр, имеют характерную грязно-желтую окраску листьев. На стадии «елочки» верхняя и нижняя части растений имеют светло-зелёную окраску, а средняя – хлорофилльную. Растения доживают до конца вегетации, сохраняя признаки угнетенности. Семенная продуктивность низкая. Мутация отнесена к типу *xantho-viridis* (рис.1 г) [8].



а)



б)



в)



г)

Рис. 1. Мутантные линии льна масличного с разным типом хлорофилльной недостаточности: а) сорт Циан (контроль), б) М-80, в) М-81, г) М-84.

Для исследования морфологии пластид отобранные листья фиксировали в смеси Темпера, содержащей 0,2 % хлорида меди, 0,2 % нитрата меди и 1 % фенола [10, 12], которая позволяет сохранить окраску хлоропластов. Затем листья парафинировали, из них готовили поперечные срезы на ротационном микротоме МПС-2 и проводили их депарафинирование. Для этого стекла с наклеенными срезами промывали в трёх сменах ксилола, двух сменах 100 % спирта, одной смене 75 % спирта, одной 50 % спирта и трёх сменах дистиллированной воды. Время нахождения в каждой среде – 2...3 минуты. Далее срезы заключали в глицерин и накрывали покровными стеклами [11]. Полученные препараты фотографировали при помощи тринокулярного микроскопа XS-3330 и окулярной камеры МА88-500 при увеличении $\times 640$ и $\times 1600$ раз. Размеры хлоропластов измеряли стандартными методами при помощи окуляр-микрометра [13]. Для характеристики пластидного аппарата рассчитывали площадь сечения и объем хлоропластов, используя методику А.Т. Мокроносова [14]. Результаты обрабатывали, используя методы стандартной математической статистики [15].

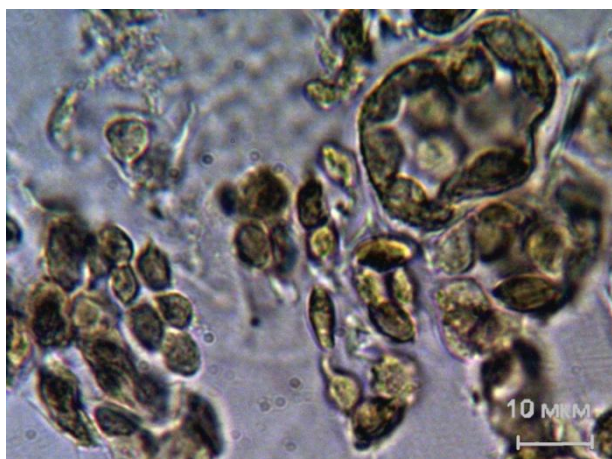
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Мутантные линии М-80, М-81 и М-84 характеризуются различным проявлением минус-хлорофилльных изменений – *viridis*, *xantha* и *xantho-viridis*, соответственно. К моменту исследования (на стадии «елочки») они имели как хлорофилльную часть, так и близкую к нормальной. При этом локализация хлорофилльного участка (верхняя, средняя или нижняя часть) на растении зависела от типа мутации. Контролем служил сорт Циан с нормальной зелёной окраской листьев (рис.1 а).

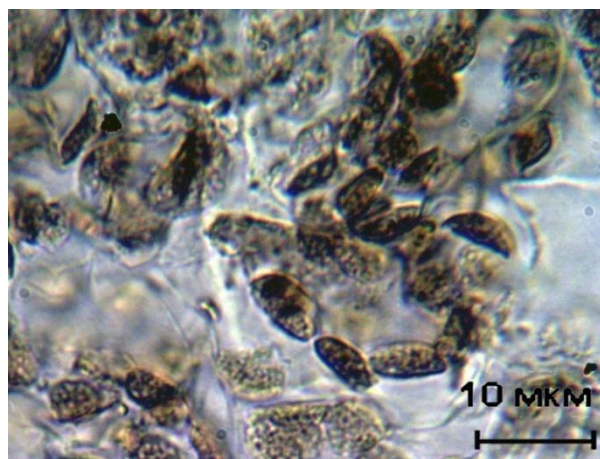
Хлорофилльные мутанты с измененными морфологическими и физиологическими признаками характеризуются изменениями в строении их пластидного аппарата. При изучении строения мезофилла листьев, нами выявлены изменения морфологии таких фотосинтетических структур клетки как хлоропласты (рис.2).

Как видно из таблицы 1, хлоропласты мутантной линии М-80 как по длине, так и по ширине, существенно отличались от сорта Циан. При этом наблюдалось уменьшение линейных размеров хлоропластов. У мутанта М-81 (*xantha*) хлоропласты были намного уже, чем у контроля, по показателю длины хлоропластов, существенных отличий не обнаружено. Хлоропласты мутантного образца М-84 по линейным показателям хлоропластов не отличались от сорта Циан.

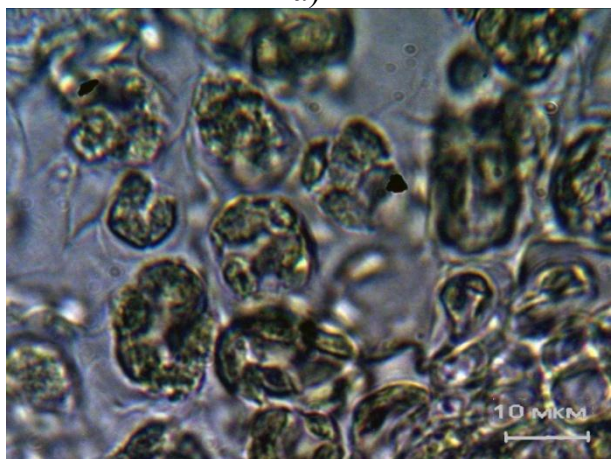
Хлорофилльные мутанты льна масличного характеризовались также изменением формы хлоропластов. На основе соотношения длины и ширины хлоропластов мутанта М-81 было выявлено, что его хлоропласты имеют цилиндрическую форму [14]. У мутанта М-84 (*xantho-viridis*) хлоропласты имели веретенообразную форму (рис.2). У мутанта М-80 (*viridis*) хлоропласты по форме не отличались от контроля.



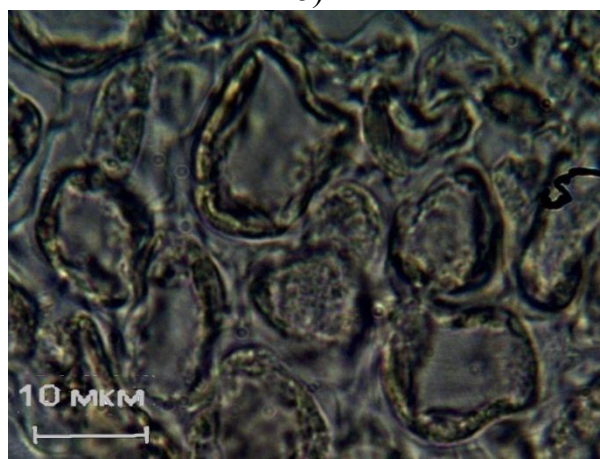
а)



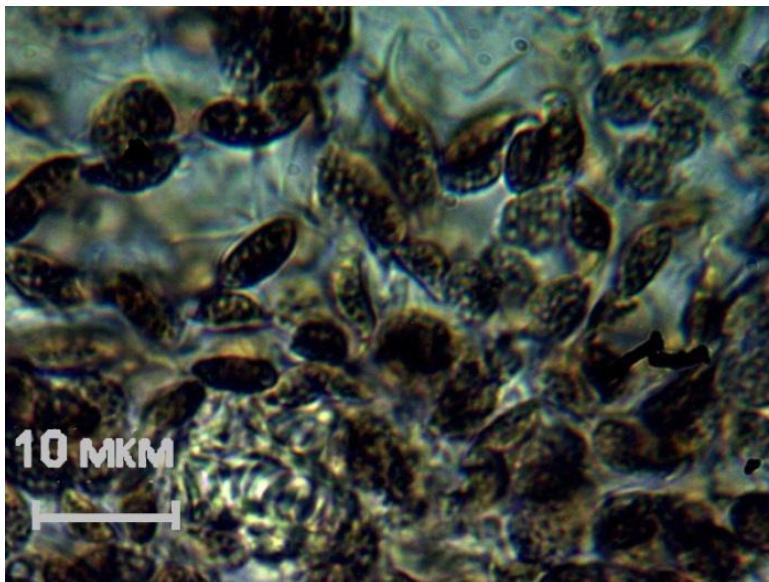
б)



в)



г)



д)

Рис. 2. Морфология пластид хлорофильных частей мутантных линий льна масличного: а) Циан (верхняя часть); б) Циан (средняя часть); в) М-80; г) М-81; д) М-84.

Таблица 1 – Линейные размеры хлоропластов хлорофильных частей мутантных линий льна масличного

Генотип	Длина хлоропластов, мкм	Ширина хлоропластов, мкм	Форма хлоропластов
Циан (верх)	4,3±0,21	2,5±0,24	хлоропласты эллипсо-подобной формы
Циан (средняя часть)	4,9±0,26	2,8±0,19	хлоропласты эллипсо-подобной формы
М-80	3,2±0,13***	1,9±0,11*	хлоропласты эллипсо-подобной формы
М-81	4,3±0,39	1,3±0,15***	хлоропласты цилиндрической формы
М-84	4,1±0,31	2,4±0,18	хлоропласты веретено-подобной формы

Примечание: *, **, *** – отличия от контроля существенны при $P < 0,05; 0,01; 0,001$.

В связи с тем, что было выявлено не только изменение размеров хлоропластов, но их формы, нами были рассчитаны показатели площади сечения и объема хлоропластов. Как видно из рисунка 3, площадь сечения хлоропластов в наибольшей степени изменяется у мутанта М-80 (в 1,7 раз). Мутант М-81 характеризуется максимальным снижением объема хлоропластов среди мутантов (в 2,4 раза). Следует отметить, что мутант М-84 характеризуется наименьшим снижением площади сечения и объема хлоропластов – в 1,3 и 1,5 раз соответственно.

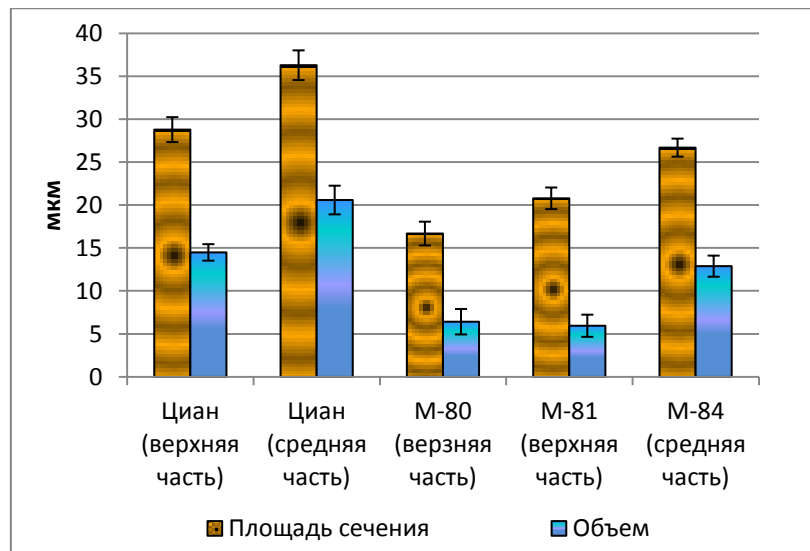


Рис. 3. Площадь сечения и объем хлоропластов хлорофилльных частей мутантных линий льна масличного.

Перспективой дальнейшего исследования является углубление представлений о анатомо-морфологических особенностях строения фотосинтетического аппарата мутантов льна масличного разным типом хлорофилльной недостаточности, установление связи этих параметров с продуктивностью растений, что позволит более детально изучить процесс фотосинтеза.

ВЫВОДЫ

Выявлено, что хлорофилльные мутанты льна масличного имеют измененный пластидный аппарат. Изменение линейных размеров хлоропластов зависит от типа мутации. Мутанты типа *xantha* и *xantho-viridis* изменяют форму хлоропластов. Мутант типа *xantha* имеет хлоропласты цилиндрической формы, в отличие от эллипсоподобной у исходного сорта. Мутант типа *xantho-viridis* характеризуется наименьшими изменениями производных параметров хлоропластов.

ЛІТЕРАТУРА

1. Живетин В. В. Масличный лен и его комплексное использование / В. В. Живетин, Л. Н. Гинзбург. – М. : Урожай, 2000. – 90 с.
2. Гаврилюк М. М. Олійні культури в Україні / М. М. Гаврилюк, В. Н. Салатенко, А. В. Чехов; [за ред. А. В. Чехова]. – К. : Основа, 2007. – 416 с.
3. Гостимский С.А. Цитогенетический анализ хлорофилльных мутантов гороха / С.А. Гостимский // Теория химического мутагенеза. – М. : Наука, 1971. – С. 64-69.
4. Ладыгин В.Г. Фотосинтез и продукционный процесс / В.Г. Ладыгин, С.В. Тагеева, Г.А. Семенова – М. : Агропромиздат, 1988. – 348 с.
5. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений / С.М. Кочубей. – К. : Альтерпрес, 2001. – 204 с.
6. Лях В.А. Индуцированный мутагенез масличных культур / В.А. Лях, И.А. Полякова, А.И. Сорока. – Запорожье: ЗНУ, 2009. – 266 с.
7. Лях В. А. Ботанические и цитогенетические особенности видов рода *Linum* и биотехнологические пути работы с ними: монография / В. А. Лях, А. И. Сорока. – Запорожье: ЗНУ, 2008. – 182 с.
8. Генетическая коллекция вида *Linum usitatissimum* L.: каталог / [сост. Лях В.А., Мищенко Л.Ю., Полякова И.А.]. – Запорожье, 2003. – 60 с.

9. Досон Р. Справочник биохимика / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.; [пер с англ. В.Л. Друца, О.Н. Королёв]. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
10. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / [Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др.]. – М. : МГУ, 2004 – 312 с.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
12. Мокроносов А.Т. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезируемых тканей и органов / А.Т. Мокроносов, Р.А. Борзенкова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1978. – Вып. 3. – С. 119-133.
13. 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: Издательство Уральского университета, 2006. – 27 с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Лакин Г.Ф. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.

REFERENCES

1. Zhivetin V.V. Maslichnyj len i ego kompleksnoe ispolzovanie / V. V. Zhivetin, L.N. Ginzburg. – М. : Urozhaj, 2000. – 90 s.
2. Gavrilyuk M. M. Olijni kulturi v Ukraïni / M. M. Gavrilyuk, V. N. Salatenko, A.V. Chexov; [za red. A. V. Chexova]. – К.: Osnova, 2007. – 416 s.
3. Gostimskij S.A. Citogeneticheskij analiz xlorofilnyx mutantov goroxa / S.A. Gostimskij // Teoriya ximicheskogo mutageneza. – М.: Nauka, 1971. – S. 64-69.
4. Ladygin V.G. Fotosintez i produkcionnyj process / V.G. Ladygin, S.V. Tageeva, G.A. Semenova – М. : Agropromizdat, 1988. – 348 с.
5. Kochubej S.M. Organizaciya fotosinteticheskogo apparata vysshix rastenij / S.M. Kochubej. – К.: Alterpres, 2001. – 204 s.
6. Lyax V.A. Inducirovannyj mutagenez maslichnyx kultur / V.A. Lyax, I.A. Polyakova, A.I. Soroka – Zaporozhe: ZNU, 2009. – 266 s.
7. Lyax V. A. Botanicheskie i citogeneticheskie osobennosti vidov roda *Linum* i biotexnologicheske puti raboty s nimi: monografiya / V. A. Lyax, A. I. Soroka. – Zaporozhe: ZNU, 2008. – 182 s.
8. Geneticheskaya kollekcija vida *Linum usitatissimum* L.: katalog / [sost. Lyax V.A., Mishhenko L.Yu., Polyakova I.A.]. – Zaporozhe, 2003. – 60 s.
9. Doson R. Spravochnik bioximika / Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K.; [per s angl. V.L. Druca, O.N. Korolyov]. – М.: Mir, 1991. – 544 s.
10. Spravochnik po botanicheskoy mикротехнике. Osnovy i metody / [Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G. i dr.]. – М.: MGU, 2004 – 312 s.
11. Pausheva Z.P. Praktikum po citologii rastenij / Z.P. Pausheva. – М.: Agropromizdat, 1988. – 271 s.
12. Mokronosov A.T. Metodika kolichestvennoj ocenki struktury i funkcionalnoj aktivnosti fotosinteziruemyx tkanej i organov / A.T. Mokronosov, R.A. Borzenkova // Tr. po prikladnoj botanike, genetike i selekcii. – 1978 – Vyp. 3. – S. 119-133.
13. Opredelenie mezostrukturnyx karakteristik fotosinteticheskogo apparata rastenij: rukovodstvo k laboratornym zanyatiyam bolshogo specpraktikuma po fiziologii i bioximii rastenij / [sost. R.A. Borzenkova, E.V. Xramcova]. – Ekaterinburg: Izdatelstvo Uralskogo universiteta, 2006. – 27 s.
14. Lakin G.F. Biometriya / Lakin G.F. – М.: Vysshaya shkola, 1990. – 351 s.