

## **ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ СУДИННОЇ ОБКЛАДИНКИ ТА МЕЗОФІЛУ У С3 І С4 ВИДІВ РОСЛИН У ЗВ'ЯЗКУ З ОПТИМІЗАЦІЄЮ ФОТОСИНТЕЗУ**

Еволюція С4-шляху фотосинтезу супроводжувалась модифікацією програми розвитку листка [1–3]. Важливою умовою ефективного функціонування С4 систем є формування анатомії Кранца, яка підтримує просторове роз'єднання метаболічних шляхів і забезпечує механізм концентрування диоксиду вуглецю для циклу Кальвіна [4, 5]. При цьому, ФЕП-карбоксилаза зосереджується в клітинах мезофілу, де відбувається первинне карбоксилювання, а Рубіско та декарбоксилази С4-кислот концентруються в клітинах обкладинки (Кранц-клітинах), де проходить декарбоксилювання та рефіксація  $\text{CO}_2$  для С3-шляху [2, 6]. У пошуках підвищення продуктивності фотосинтезу (і показників RUE, NUE та WUE) основних харчових С3 культур, розробки ефективних методів трансформації С3 рослин у С4, а також скринінгу мутантів, необхідно визначити зміни в анатомії листка, які зумовлюють оптимізацію фотосинтезу і становлення С4 типу, саме утворення двокамерної С4 системи, або анатомії Кранца. Для цього нами було проведено порівняльне дослідження структурної організації обкладинки судинної системи та хлоренхіми листків у С3 і С4 однодольних та дводольних видів рослин із зазначенням особливостей їхньої диференціації.

### **Матеріали і методи**

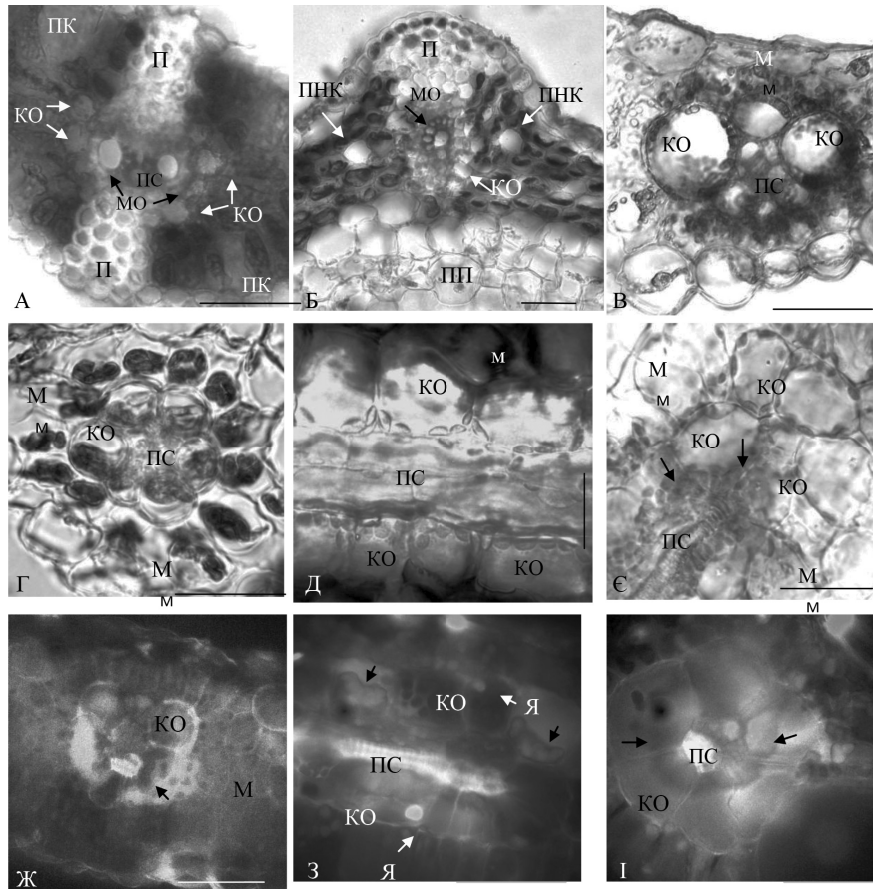
Об'єкти дослідження: С3-однодольні рослини — ячмінь і традесканція, С4-однодольні — кукурудза та сорго, С3-дводольна — горох та С4-дводольна — амарант. Листки фіксували у суміші параформальдегіду і глутаральдегіду або досліджували свіжий нефіксований матеріал. Одну частину зрізів аналізували без фарбування, іншу фарбували, застосовуючи оцетокармін та реактив Люголя для світлової, аніліновий блакитний (АВ, 0,025%) і DAPI (2,5 мкг/мл) — для люмінесцентної мікроскопії. Зрізи виготовляли вручну під стереомікроскопом. Окрім виготовлення зрізів, частину матеріалу аналізували, використовуючи ферментативну мацерацію для видалення судин з тканин листка. Спостерігали

за рухом хлоропластів в клітинах обкладинки та хлоренхіми в листках амаранту за умов зміненого режиму освітлення. Тимчасові препарати вивчали в прохідному та ультрафіолетовому світлі за допомогою мікроскопу Axiostar (Carl Zeiss, Німеччина).

### **Результати та обговорення**

*Анатомія листка С3-однодольних.* У ячменю провідні судини в листку займають 1/6–1/7 від площі мезофілу. Хлоренхіма губчаста, не диференційована на стовпчасту, з добре розвинутою мережею міжклітинників та повітряних камер. Судини оточені подвійною обкладинкою (рис. 1, А). Внутрішня, або местомна, складається з плоских живих клітин з потовщеною кутинізованою оболонкою. Внутрішні стінки клітин мають більш потужні потовщення, ніж зовнішні. В цитоплазмі клітин міститься незначна кількість хлоропластів. Местомна обкладинка багатьох судин має, так зване «подовження» (П) з кутинізованих клітин, яке досягає поверхні листків (рис. 1, А). Вважають, що це «подовження» істотно збільшує площу контакту між мезофілом і судинами [7]. Зовнішня обкладинка складається з великих паренхімних клітин з нещільною цитоплазмою і потовщеними стінками (рис. 1, А). Основний вміст клітин займає велика центральна вакуоль, периферію — тяжі цитоплазми з пластидами та іншими органелами. Клітини зовнішньої обкладинки сполучаються як з клітинами «подовження», так і міжклітинниками і продиховими камерами. Вважають, що внутрішня і зовнішня обкладинки мають різне походження: местомна — прокамбіальне (аналог ендодерми), а зовнішня є похідною паренхіми [7].

У традесканції анатомія листка в цілому схожа з ячменною. З особливостей потрібно відзначити добре розвинуту повітряну паренхіму у вигляді суцільної тканини або окремих клітин (рис. 1, Б). Клітини обкладинки містять незначну кількість пластид. Отже, серед однодольних С3 рослин саме у злаків спостерігається удосконалення судинної системи та мезофілу для оптимізації фотосинтезу — зростання розмірів та зба-



**Рис. 1.** Анатомія обкладки термінальних судин у С3 і С4 рослин: А — подвійна (местонна і паренхімна) обкладка судин у ячменю, Б — подвійна обкладка судин у традесканції, В — різновеликі клітини простої обкладки у проростків кукурудзи, Г — Кранц анатомія у сорго, Д — судини і клітини обкладки у гороха, Є–І — обкладка судин у амаранта (ПС – провідні судини, КО — клітини обкладки, МО — местонна обкладка, П — «подовження» обкладинок, ПК — повітряні камери, ПП — повітряна паренхіма, ПНК — повітряноносні клітини, М — мезофіл, стрілками зазначено местонну та паренхімну обкладки (А, Б), агрегацію пластид (Є–І), ядро (З), (А–Є — нефарбований матеріал, Ж – І – АБ (аніліновий блакитний) + DAPI. Реперна мітка = 20 мкм

гачення на пластиди клітин обкладки та збільшення площі їх взаємодії з мезофілом.

*Анатомія листка С4-однодольних.* У кукурудзи та сорго судини в листках займають велику площу, приблизно таку ж, як і хлоренхіма (1:1). Судини щільно оточені великими (витягнутими вздовж судин і сферичними на зрізі) клітинами з потовщеною оболонкою, які утворюють просту обкладку (рис. 1, В, Г). Местонна обкладка навколо судин та «подовження» обкладинок у цих рослин відсутні. Хлоропласти клітин обкладки розташовані у периферичному домені та агрегуються здебільшого збоку клітин мезофілу. Зовні клітини внутрішньої обкладки оточуються радіально розташованими клітинами мезофілу, які створюють зовнішнє коло. Пластиди в клітинах мезофілу займають полярне положення відносно до клітин обкладки. Таким чином створю-

ються два радіальних кола клітин з полярно розташованими пластидами, або анатомія Кранца (рис. 1, В, Г). Виразність такої структури, розташування та розміри хлоропластів, їх диморфізм варіюють залежно від виду рослини та етапу онтогенезу. Центральним структурним і функціональним елементом у тканинах листка С4 рослин стає судинна обкладка, клітини якої зростають в об'ємі, збагачуються на хлоропласти і беруть на себе головне навантаження у фотосинтезі — вторинне карбоксилювання.

*Анатомія листка С3-дводольних.* Листок гороху має слабо диференційований мезофіл, але добре розвинуті міжклітинники. Судини займають 1/7–1/8 від загальної площини мезофілу. Термінальні судини оточені одинарною обкладкою з вакуолізованих сферичних клітин з потовщеною оболонкою (рис. 1, Д). Клітини

обкладинки у периферичному компартменті містять хлоропласти та сполучаються з повітряними камерами. Клітини мезофілу значно багатші на хлоропласти, ніж обкладинки. Після ферментативної мацерації судини повністю відокремлюються від тканин мезофілу та обкладинки; при подовженні мацерації судини розпадаються на флоемні і ксилемні елементи.

*Анатомія листка С4-дводольних.* Судинний візерунок листків амаранту щільніший, ніж у гороху. Судини оточуються великими сферичними вакуолізованими клітинами з потовщеною оболонкою, до складу якої входить калоза та/або лігніни (рис. 1, Є–І). У периферичному компартменті клітин обкладинки, а саме з боку судин, скупчується велика кількість хлоропластів, а з протилежного боку звичайно розташовується ядро (рис. 1, З). Зовні клітини обкладинки оточуються радіальними клітинами хлоренхіми та сполучаються з продиховими камерами. Клітини мезофілу містять менші за розміром та кількістю хлоропласти. Після ферментативної мацерації судини відокремлюються від тканин мезофілу, зберігаючи структуру Кранц анатомії; при подовженні ензимної обробки зв'язок між судинами і клітинами обкладинки не порушується. Отже, у С4 рослин разом з функціональним навантаженням та збагаченням на органели клітин обкладинки посилюється фізичний зв'язок між судинами та обкладинкою.

Аналіз руху хлоропластів в листках амаранту за умов зміненого режиму освітлення вказує на відносну сталість структурно-динамічних ознак клітин обкладинки, порівняно з хлоренхімою. Чисельні хлоропласти цих клітин займають периферичну цитоплазму, зосереджуючись переважно з боку судин, а ядра локалізуються у протилежному компартменті (рис. 1, Є–І). Зміна освітлення суттєво не впливає на агрегацію хлоропластів в клітинах обкладинки. В той же час, хлоропласти клітин хлоренхіми легко змінюють свою локалізацію: агрегація хлоропластів модифікувалась освітленням та близькістю повітряних камер. Вважають, що важливу роль у світлозалежній агрегації хлоропластів відіграють активні мікрофіламенти, причому цей процес може здійснюватися через регуляцію балансу пулів G- і F-актину поблизу поверхні органел [8–10]. Динамічність у локалізації органел клітин хлоренхіми, яка пов'язана з функцією первинного карбоксилювання, може також відображати «сенсорно-бу-

ферні» властивості цієї тканини, що пом'якшує дію подразників на клітини обкладинки. Однак роль організаційного центру та індуктора Кранц анатомії виконують, як вважають, термінальні судини [11–13]. Причому, С4-індукуючі сигнали сприймаються тільки клітинами, які знаходяться в радіусі дії судин [15]. Разом із судинами, центральним структурно-функціональним елементом листка як асимілюючого органа стає обкладинка, клітини якої зростають в об'ємі, збагачуються на хлоропласти і беруть на себе функцію вторинного карбоксилювання. Цікавим є те, що становлення С4 шляху і анатомії Кранца відбувається в онтогенезі не одразу, а протягом певного часу. Так, у проростків кукурудзи чітка спеціалізація протеому клітин обкладинки і мезофілу починає формуватися тільки на автотрофній стадії розвитку, а на анатомічній структурі вона відображається значно пізніше [16].

### Висновки

Анатомічні особливості С3 і С4 рослин є відображенням різних шляхів диференціації тканин (судин і мезофілу) листків. У С3 однодольних, особливо злаків, функціонування фотосинтетичного апарату супроводжується спеціалізацією та ускладненням організації обкладинки судин — формуванням додаткової местомної обкладинки та кутинізацією її стінок, «подовженням» обкладинок до поверхні листка, а також розвитком повітряної паренхіми. При становленні С4 метаболізму відбулося спрощення будови обкладинки судин (редукція местомної обкладинки та її «подовження») і диференціація мезофілу на Рубіско-вмісні клітини обкладинки та збагачену ФЕПКО-хлоропластами губчасту хлоренхіму. Отже, С3- і С4-рослини використовують різні засоби концентрування  $\text{CO}_2$  (і асимілятив) клітинами обкладинки. Структурні пристосування С4 рослин є досконалішими: з одного боку, зростає ефективний простір судин і обкладинки, збільшуються площа та міцність їхньої взаємодії, з іншого, зменшується об'єм тканини мезофілу, яка постачає їм  $\text{CO}_2$ . Судини разом з обкладинкою стають індукторами та організаторами Кранц анатомії, а клітини мезофілу — джерелом  $\text{CO}_2$ , і «буферною зоною» відносно обкладинки. Таким чином, оптимізація фотосинтезу із становленням С4 метаболізму тісно пов'язана з формуванням анатомії Кранца і, перш за все, спеціалізацією обкладинки термінальних судин.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гамалей Ю.В., Вознесенская Е.В. Структурные и биохимические типы C4-растений // Физиология растений. — 1986. — 3, № 4. — С. 802–819.
2. Hatch M.D. C 4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure // Biochim Biophys Acta. — 1987. — 895. — P. 81–106.
3. Langdale J.A. C4 Cycles: Past, Present, and Future Re arch on C4 Photosynthesis // The Plant Cell. — 2011. — 23. — P. 3879–3892.
4. Edwards G.E., Franceschi V.R., Voznesenskaya E.V. Single-cell C (4) photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — 55. — P. 173–196.
5. Edwards G.E., Voznesenskaya E.V. C4 photosynthesis: Kranz forms and single-cell C4 in terrestrial plants. In: Raghavendra AS, Sage RF, eds. Photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. Advances in Photosynthesis Research. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2011. — P. 29–60.
6. Эдвардс Д. Фотосинтез C 3- и C 4-растений: механизмы и регуляция. — М.: Мир, 1986. — 590 с.
7. Эсау К. Анатомия растений. — М.: Мир, 1980. — 1, 2. — 558 с.
8. Parthasarathy M.V. F-actin Architecture in Coleoptile Epidermal Cells // Eur. J. Cell Biol. — 1985. — 39. — P. 1–12.
9. Chuong S.D.X., Franceschi V.R., Edwards G.E. The Cytoskeleton Maintains Organelle Partitioning Required for Single-Cell C4 Photosynthesis in Chenopodiaceae Species // The Plant Cell. — 2006. — 18. — P. 2207–2223.
10. Yamada M., Kawasaki M., Sugiyama T., Miyake H., Taniguchi M. Differential Positioning of C 4 Mesophyll and Bundle Sheath Chloroplasts: Aggregative Movement of C 4 Mesophyll Chloroplasts in Response to Environmental Stresses // Plant Cell Physiol. — 2009–50 (10). — P. 1736–1749.
11. Monson R.K., Schuster W.S., Ku M.S.B. Photosynthesis in *Flaveria brownii* A.M. Powell: A C4-like C3-C4 intermediate. Plant Physiol. — 1987. — 85. — P. 1063–1067.
12. Cheng S.-H., Moore B.D., Wu J., Edwards G.E., Ku M.S.B. Photosynthetic plasticity in *Flaveria brownii*. Growth irradiance and the expression of C4 photosynthesis // Plant Physiol. — 1989. — 89. — P. 1129–1135.
13. McKown A.D., Dengler N.G. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C4 vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae) // Am. J. Bot. — 2007. — 94. — P. 382–399.
14. McKown A.D., Dengler N.G. Shifts in leaf vein density through accelerated vein formation in C4 *Flaveria* (Asteraceae) // Ann.Bot. (Lond.) . — 2009. — 104. — P. 1085–1098.
15. Langdale J.A., Nelson T. Spatial regulation of photosynthetic development in C4 plants // Trends Genet. — 1991. — 7. — P. 191–196.
16. Majeran W., Friso G., Ponnala L., Connolly B., Huang M., Reidel E., Zhang C., Asakura Y., Bhuiyan N.H., Sun Q., Turgeon R., van Wijk K.J. Structural and metabolic transitions of C4 quantitative proteomics in maize // Plant Cell. — 2010. — 22. — P. 3509–3542.

**KRAVETS E.A., HORIUNOVA I.I., YEMETS A.I., BLUME Ya.B.**

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: kravetshelen@gmail.com*

#### **DIFFERENTIATION OF LEAF VEIN BUNDLE SHEATH AND MESOPHYLL CELLS IN C3 AND C4 SPECIES IN CONNECTION WITH PHOTOSYNTHESIS OPTIMIZATION**

**Aims.** The comparative anatomical study of the bundle sheath and mesophyll in C3 and C4 species to determine the changes in leaf anatomy that cause the formation of two-chamber C4 system named Kranz anatomy. **Methods.** Light and fluorescent microscopy. **Results.** Anatomical features of C3 and C4 plants is a reflection of the various ways of differentiation of leaf tissues (bundle sheath and mesophyll cells). In monocots C3 plants the functioning of the photosynthetic apparatus is accompanied by specialization and complexity of the bundle sheath, namely the formation of additional mestomic bundle sheath, cutynization of the cell walls, “lengthening” of bundle sheath cells to the leaf surface and the development of air parenchyma. The simplification of the bundle sheath structure (reduction of mestomic cover and its «lengthening») and differentiation of mesophyll to the Rubisco-containing bundle sheath and FEPK-enriched mesophyll chloroplasts occur by formation of C4 metabolism. **Conclusions.** C3 and C4 plants use different ways of CO<sub>2</sub> concentration and assimilates of the bundle sheath cells. Structural adjustment of C4 plants are more advanced: grow of effective space of vien and bundle sheath while area of mesophyll cells are reduced. The mesophyll cells are characterized by expressive dynamic properties than the bundle sheath. Veins become the inductors of Kranz anatomy while hlorenhima cells serve as a source of CO<sub>2</sub> and the «buffer zone».

**Keywords:** leaf veins, bundle sheath, mesophyll cells, Kranz anatomy, C3 and C4 species.