

СООБЩЕНИЯ

ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПЛАСТИД
И ПИГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА
В ПРОЦЕССЕ МОРФОГЕНЕЗА ПОДЗЕМНЫХ ПОБЕГОВ
ACHILLEA MILLEFOLIUM (ASTERACEAE)

© 2019 г. С. П. Маслова^{1,*}, О. В. Дымова¹, С. Н. Плюснина¹

¹ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН
ул. Коммунистическая, 28, г. Сыктывкар, 167000, Россия

*e-mail: maslova@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 27.03.2019 г.

После доработки 10.11.2019 г.

Принята к публикации 12.11.2019 г.

Впервые получены количественные данные об ультраструктурных изменениях пластид и содержании фотосинтетических пигментов в процессе фотоморфогенеза верхушки подземного побега при переходе от диагравитропной к ортотропной ориентации роста у растений *Achillea millefolium*. На фотофобном этапе в этиолированной верхушке корневища система внутренних мембран лейкопластов представлена периферическим ретикулумом, одиночными тилакоидами стромы, отмечены проламеллярные тела. Хлорофиллы и каротиноиды присутствовали в следовых количествах, из каротиноидов обнаружены ксантофиллы, в основном лютеин (70%). С переходом от фотофобного к фотофильному этапу морфогенеза в зеленеющей верхушке сармента (зачатки листьев) отмечены хлоропласты с активно развивающейся гранальной системой. Содержание фотосинтетических пигментов составляло 1.0–1.2 мг/г сухой массы, что на порядок больше по сравнению с этиолированными корневищами. Выявлено увеличение фонда Хл *a*¹ в большей степени, чем Хл *b*, что отражает становление фотосистем и увеличение числа реакционных центров в процессе зеленения. В верхушке сармента среди каротиноидов обнаружены β-каротин, лютеин, виолаксантин, неоксантин и в небольшом количестве зеаксантин. Листья сарментов содержали значительное количество хлорофиллов и каротиноидов (5.3 мг/г сухой массы), что коррелировало с увеличением числа хлоропластов с развитаой системой фотосинтетических мембран.

Ключевые слова: корневище, сармент, *Achillea millefolium*, фотоморфогенез, ультраструктура, хлорофиллы, каротиноиды

DOI: 10.1134/S0006813619110127

ВВЕДЕНИЕ

Конус нарастания подземных побегов длиннокорневищных травянистых многолетников периодически формирует почки, которые затем переходят в надземный побег – сармент. Апикальная часть сармента в процессе подземного горизонтального роста дифференцируется, образуя зачатки ассимилирующих листьев (Markarov, Golovko, 1995a). Экспериментально доказано, что ориентация роста подземных побегов контролируется фитохромной системой (Markarov, Golovko, 1995b). Фитохром в

¹ Сокращения: Хл *a* – хлорофилл *a*, Хл *b* – хлорофилл *b*, Кар – каротиноиды, АБК – абсцизовая кислота.

форме красного контролирует горизонтальный рост корневищ под поверхностью почвы, а фитохром в форме дальнего красного препятствует выходу верхушки побегов на поверхность почвы. Регуляторные функции фитохрома реализуются в зависимости от процессов органогенеза в конусе нарастания подземного побега. Фотофобный период развития подземного побега характеризуется образованием метамеров с чешуевидными листьями, диагравитропизмом и отрицательным фототропизмом. В фотофильный период происходит образование зеленых развитых листьев, побеги проявляют положительный фототропизм.

Гетерогравитропность подземных почек, обеспечивающая ветвление корневища и образование надземных ассимилирующих побегов, является уникальным биологическим свойством, которое сформировалось и закрепилось на этапах филогенетической трансформации жизненных форм растений (Maslova, Golovko, 2017). К настоящему времени мало что известно о механизмах регуляции гетерогравитропизма подземных вегетативных меристем. Слабо изучен морфогенез подземных побегов – корневищ (Markarov, Golovko, 1995a, б; Maslova et al., 2007, 2013; Maslova, Golovko, 2017; Yoshida et al., 2016). Показано, что в процессе фотоморфогенеза корневищ *Achillea millefolium*, при переходе верхушки побега от диатропного к ортотропному росту, повышается уровень гормональной активности, содержание олигосахаридов (Maslova et al., 2007; 2013).

Результаты исследования латеральных подземных меристем многолетних злаков р. *Leymus* свидетельствуют о полиморфизме экспрессируемых генов, вовлеченных в гравитропический ответ подземных почек, проявляющих отрицательный гравитропизм (короткокорневищные травы) и диагравитропизм (длиннокорневищные травы) (Kaur et al., 2008). В гетеротрофных тканях верхушки корневища тростника (*Phragmites australis*) выявлено присутствие генов белков фотосистемы I и II, хлорофилла *a*, апопротеина A1 и фототропина-2 (Ruifeng et al., 2012). Механизмы формирования фотосинтетического аппарата в процессе деэтиляции довольно полно изучены у проростков растений (Reinbothe et al., 2010; Solymosi, Schoefs, 2010; Garmash et al., 2013). Сведения о фотоморфогенезе подземных побегов единичны (Markarov, Golovko, 1995a; 1995b; Maslova, Golovko, 2017), а работ по изучению структуры и физиологического состояния верхушки корневища при переходе от фотофобного к фотофильному этапу развития практически нет.

Целью данной работы было изучить изменения ультраструктуры пластид и пигментного комплекса в процессе фотоморфогенеза верхушки подземного побега длиннокорневищного вида *Achillea millefolium*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Achillea millefolium L. (тысячелистник обыкновенный) – многолетний летнезеленый травянистый тонко-длиннокорневищный симподиально нарастающий поликарпик с удлинненным прямостоячим побегом (Bezdelev, Bezdeleva, 2006). Растения *A. millefolium* формируют корневища – подземные побеги с диатропной (горизонтальной) ориентацией роста. Конус нарастания корневищ периодически формирует почки, которые переходят в надземный побег – побег закрепления (Serebryakov, Serebryakova, 1965). Такой тип побега называют также сарментом – подземным побегом, способным переходить из диатропного в ортотропный (ассимилирующий) побег, минуя период покоя (Markarov, Golovko, 1995). Апикальная часть сармента в процессе определенного периода подземного горизонтального роста дифференцируется и формирует фотофильный гистологический комплекс, происходит образование зеленых листьев. В фазу цветения растение *A. millefolium* образует до 30 подземных побегов, из которых 25% составляют сарменты (Maslova et al., 2013).



Рис. 1. Фотоморфогенез подземного побега *Achillea millefolium*. 1 – верхушка побега (корневища) на фотофобном этапе, 2 – зеленеющая верхушка сармента, 3 – формирование листьев сармента, 4 – сформированные листья сармента. Линейка: 10 см.

Fig. 1. Photomorphogenesis of the *Achillea millefolium* underground shoot. 1 – the etiolated rhizome apex, 2 – the greening rhizome apex, 3 – formation of sarment leaves, 4 – developed leaves of sarment. Bar: 10 cm.

Растения выращивали из корневищ в вегетационном опыте при площади питания $0.4 \times 0.7 \text{ м}^2$. Верхушки подземных побегов (0.3–1 см) отбирали в период генеративного развития растений (август). Верхушки побегов исследовали на разных этапах органо-генеза апикальной почки. На фотофобном этапе изучали этиолированные верхушки корневищ, на фотофильном – зеленеющие верхушки сарментов и формирующиеся листья сарментов (рис. 1). Опыты проводили в 2016–2018 гг.

Для электронно-микроскопических исследований фрагменты верхушек 5–7 подземных побегов на разных стадиях морфогенеза фиксировали в течение 4.5 ч в 2.5%-ном глутаральдегиде, приготовленном на фосфатном буфере с pH 7.4. Постфиксацию проводили в 1%-ном водном растворе осмиевой кислоты в течение 8 ч. После дегидратации в серии растворов спирта и ацетона образцы заключали в смолу Эпон-812. Ультратонкие срезы были получены с помощью ультрамикротома PowerTome PC (Voeckeler Instruments, США). Просмотр и фотосъемку поперечных срезов первого междоузлия и листовых органов (кроющей чешуйки и листа) подземных побегов проводили на трансмиссионном электронном микроскопе Tesla BS 500 (Чехословакия). Измерения клеточных органелл проводили в 10–30-кратной повторности.

Содержание хлорофиллов и каротиноидов в исследуемых образцах определяли на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония) в ацетоновой вытяжке при максимумах поглощения – 662 и 644 нм для хлорофилла *a* и *b* соответственно, 478 нм – для каротиноидов. Для анализа состава каротиноидов зафиксированные в жидком азоте пробы хранили при –80°C. Разделение индивидуальных Кар проводили с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (“Knauer”, Германия) в соответствии с модифицированным методом (Gilmore, Yamamoto, 1991) после экстрагирования элюентом А (ацетонитрил: метанол: вода = 75:12:4). Для построения градуировочных кривых использовали стандарты чистых веществ (пигментов) (“Sigma” и “Fluka”, США). Определение пигментов проводили в 3–5 биологических и 2 аналитических повторностях.

В таблицах представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки. Статистическую значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента или теста Дункана. *P*-величину рассчитывали при заданном уровне значимости α 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ультраструктура пластид верхушек подземных побегов – корневищ и сарментов. Исследование ультраструктуры пластид в клетках верхушек подземных побегов показало различия между корневищами и сарментами, между междоузлиями побегов и листовыми органами. Показано, что первые от верхушки междоузлия корневища и сармента имели одинаковую схему строения и содержали структурные элементы, характерные для сформированного междоузлия подземного побега: эпидерму, коровую паренхиму, схизогенные секреторные каналы в ней, коллатеральные проводящие пучки по периферии центрального цилиндра, сердцевину, заполненную паренхимными клетками (Plyusnina et al., 2013). В клетках паренхимы основной объем занимала центральная вакуоль, цитоплазма имела пристеночное положение, содержала ядро и небольшое количество органелл, параметры которых значительно варьировали (табл. 1). Отмечены хорошо развитые митохондрии, число которых было выше в сарментах по сравнению с корневищами.

В паренхимных клетках междоузлий этиолированной верхушки корневищ пластиды встречались единично и были представлены лейкопластами и амилопластами неправильной формы (табл. 1; таблица I, 1). Система внутренних мембран лейкопластов состояла из периферического ретикулума и/или 1–3 одиночных тилакоидов стромы. На поперечных срезах кроющихся чешуек в паренхимных клетках число пластид с площадью сечения около 2 мкм² варьировало от 1 до 9. В лейкопластах встречались проламеллярные тела, в цистернах внутренних мембран показано накопление осмиофильного вещества (таблица I, 2). Крахмал присутствовал у трети пластид. В них одновременно могли накапливаться включения белковой природы и/или пластоглобулы. Схожие пластиды описаны для запасующих клеток молодых корней сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. (Atlas..., 1980).

Как и следовало ожидать, при переходе верхушек подземных побегов от фотофобного к фотофильному этапу развития в ультраструктуре пластид происходят существенные изменения. Междоузлия зеленеющей верхушки характеризовались наличием лейкопластов и амилопластов с большей площадью сечения, чем у этиолированной верхушки корневищ (табл. 1, таблица I, 3). Система внутренних мембран была представлена одиночными тилакоидами, изредка встречались плохо развитые граны. В зачатках листьев верхушек зеленеющих сарментов пластиды были представлены хлоропластами (табл. 2). При дальнейшем формировании листа число и размер пластид в клетках мезофилла практически не изменялись. В хлоренхиме молодых листьев показано увеличение суммарного количества тилакоидов на срез хлоропласта вдвое за счет роста числа гран. Крахмальные зерна встречались редко и составляли 5–7% от

Таблица 1. Сравнительная характеристика митохондрий и пластид паренхимных клеток междоузлий верхушек подземных побегов

Table 1. Comparative characteristics of mitochondria and plastids of parenchymal cells of internodes of underground shoot apices

Параметры Characteristics	Корневище Rhizome	Сармент Sarment
Число митохондрий на срез клетки Number of mitochondria per cell section	5.4 ± 2.1 1–10	8.6 ± 3.1 4–21
Площадь митохондрий, мкм ² Mitochondria section area, μm ²	0.41 ± 0.10 0.21–0.81	0.44 ± 0.03 0.39–0.49
Число пластид на срез клетки Number of plastids per cell section	0.7 ± 0.7 0–4	1.1 ± 0.8 0–3
Площадь лейкопласта, мкм ² Leucoplast section area, μm ²	0.80 ± 0.31 0.46–1.35	1.34 ± 0.11 1.18–1.50
Площадь амилопласта, мкм ² Amyloplast section area, μm ²	1.83 ± 0.59 0.59–2.73	5.16 ± 1.37 3.06–9.36

Примечание. В числителе представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки ($n = 10–30$); в знаменателе – минимальные и максимальные значения.

Note. The average values \pm standard error of mean are given above the line ($n = 10–30$), minimum and maximum values are given under the line.

объема пластиды. Строма хлоропластов характеризовалась низкой электронной плотностью (таблица 1, 4).

В более зрелых листьях сармента отмечено увеличение числа хлоропластов в 3 раза по сравнению с молодыми листьями (табл. 2; таблица 1, 5). Суммарное число фотосинтетических мембран на срез хлоропласта увеличивалось в 2 раза за счет возрастания числа тилакоидов в гране. Около 70% хлоропластов содержали крахмал, парциальный объем которого составлял в среднем 20%. Площадь сечения хлоропласта с крахмалом в клетках мезофилла зрелых листьев увеличивалась более чем в два раза по сравнению с молодыми. Отмечено увеличение электронной плотности стромы пластид в зрелых листьях.

Следует отметить, что в клетках растущей хлоренхимы постепенно увеличивалось число митохондрий: от 7 в зеленеющих верхушках до 11 органелл на срез клетки сформированного листа. С развитием пластидома и хондриома повышалась электронная плотность и объем цитоплазмы.

Содержание фотосинтетических пигментов в верхушках подземных побегов – корневищ и сарментов. В верхушках корневищ фотосинтетические пигменты присутствовали в незначительном количестве (табл. 3). В пигментном фонде преобладал хлорофилл, его концентрация составляла менее 0.1 мг/г сухой массы. Следует отметить, что на фотофобном этапе развития корневищ Хл *a* и Хл *b* присутствовали примерно в равном количестве. Абсолютное и относительное содержание каротиноидов было довольно низким.

По сравнению с этиолированными корневищами, зеленеющие верхушки сарментов содержали на порядок больше фотосинтетических пигментов. При этом фонд Хл *a* увеличивался в большей степени, чем Хл *b*, о чем свидетельствует соотношение хлорофиллов. Интенсивное накопление фотосинтетических пигментов продолжалось и в формирующихся листьях сарментов. При этом по соотношению Хл *a*/Хл *b* и Хл/Кар

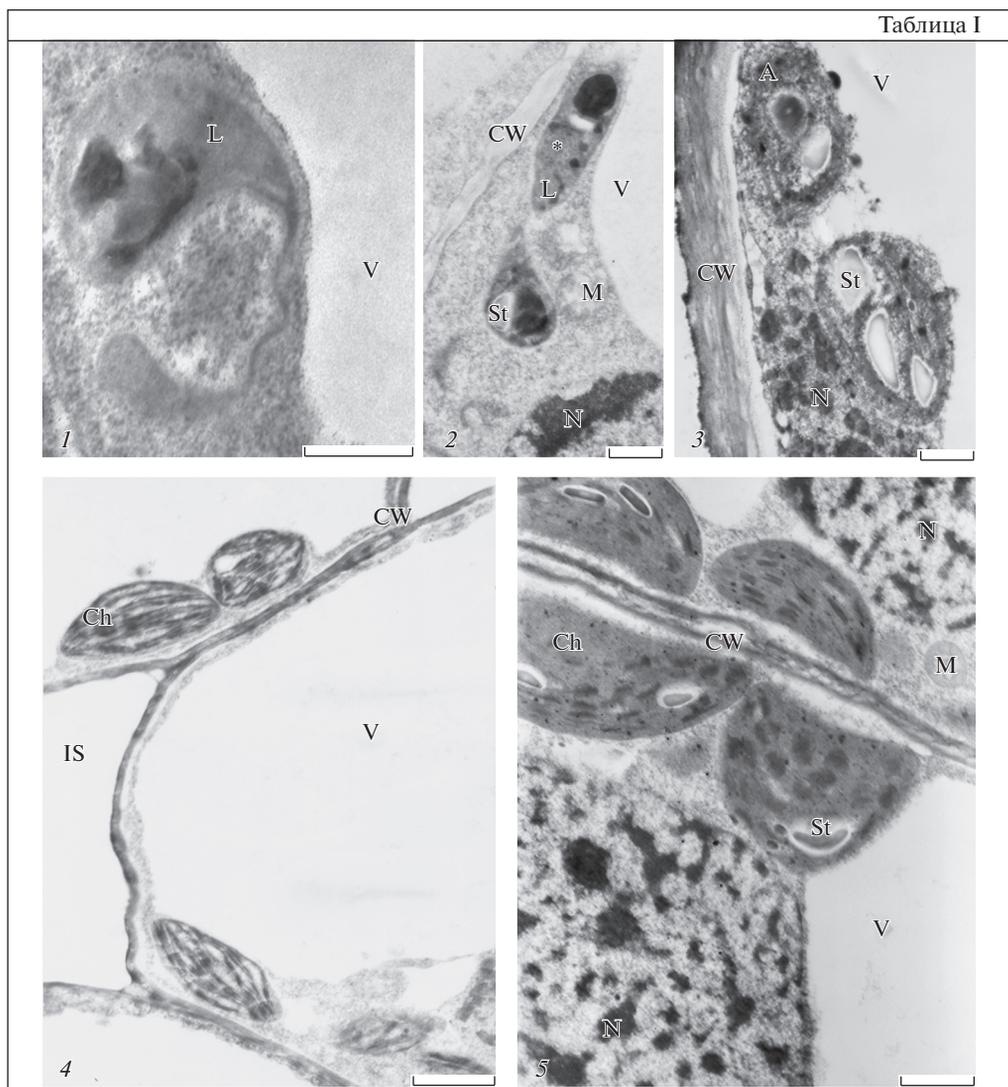


Таблица I. Пластиды в верхушках подземного побега *Achillea millefolium*. 1 – лейкопласт в коровой паренхиме междоузлия корневища; 2 – лейкопласты в паренхимных клетках крошащей чешуйки корневища; 3 – амилопласты в паренхимной клетке междоузлия сармента; 4 – хлоропласты в мезофилле молодого листа сармента; 5 – хлоропласты в мезофилле зрелого листа сармента. А – амилопласт, V – вакуоль, CW – клеточная оболочка, S – крахмал, L – лейкопласт, IS – межклетник, Ch – хлоропласт, N – ядро, * – проламеллярное тело. Масштабные линейки, мкм: 1 – 0,5, 2 – 1, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 2.

Plate I. Plastids in the apexes of underground shoot tissues of *Achillea millefolium*. 1 – leucoplast in the cortical cells of rhizome internode; 2 – leucoplasts in parenchymal cells of the renal scales of the rhizome; 3 – amyloplasts in the cortical cell of sarment internode; 4 – chloroplasts in the mesophyll of young leaf of sarment; 5 – chloroplasts in the mesophyll of mature leaf of sarment. A – amyloplast, V – vacuole, CW – cell wall, S – starch, L – leucoplast, IS – intercellular space, Ch – chloroplast, N – nucleus, * – prolamellar body. Scale bars, μm : 1 – 0.5, 2 – 1, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 2.

молодые листья сарментов мало отличались от зеленеющей верхушки с зачатками листьев. В более зрелых листьях ортотропного побега (сармента) на фоне увеличения содержания фотосинтетических пигментов их соотношение практически не изменялось.

Таблица 2. Структурные параметры хлоропластов в верхушках подземных побегов – сарментов растений *Achillea millefolium*

Table 2. Parameters of chloroplasts in the underground shoot (sarment) apexes of *Achillea millefolium* plants

Параметры Characteristics	Зеленеющая верхушка сармента Greening apex of sarment	Молодой лист сармента Young leaf of sarment	Сформированный лист сармента Developed leaf of sarment
Число хлоропластов на срез клетки Number of chloroplasts per cell section	3.0 ± 1.2	3.6 ± 1.5	13.3 ± 3.1**
Доля пластид с крахмалом, % Share of plastids with starch, %	–	–	66.4 ± 13.1
Парциальный объем крахмального зерна, % Partial volume of starch grain, %	–	7.7 ± 1.5	20.1 ± 8.8
Площадь сечения хлоропласта без крахмала, мкм ² Chloroplast section area without starch, μm ²	4.5 ± 1.5	4.4 ± 1.1	4.5 ± 1.0
Площадь сечения хлоропласта с крахмалом, мкм ² Chloroplast section area with starch, μm ²	–	5.3 ± 0.9	13.1 ± 3.3
Число гран на срез хлоропласта Number of grains per chloroplast section	16.7 ± 3.1	27.8 ± 9.7*	30.8 ± 4.2**
Число тилакоидов в гране Number of thylakoids per grain	2.9 ± 0.8	3.9 ± 1.5	6.4 ± 2.9**

Примечание. “–” – прочерк означает единичное присутствие пластид с крахмалом. Представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки ($n = 10-30$). Различия между зеленеющей верхушкой и листьями сармента статистически значимы при * – $P < 0.05$; ** – $P < 0.001$.

Note. The dash (“–”) marks the presence of single plastids with starch. The averages and their standard errors are shown ($n = 10-30$). Differences between the greening apex of sarment and sarment leaves are significant at $P < 0.05$ (*) and $P < 0.001$ (**).

Таблица 3. Содержание хлорофиллов, каротиноидов и их соотношений в верхушках подземных побегов растений *Achillea millefolium* на разных этапах морфогенеза

Table 3. Content of chlorophyll, carotenoids and their ratio in the underground shoot apexes at different morphogenesis stages of *Achillea millefolium* plants

Этапы развития Development stages	хлорофилл a + b, мг/г сухой массы chlorophyll a + b, mg/g DW	хлорофилл a	сумма каротиноидов, мг/г сухой массы carotenoids, mg/g DW	хлорофилл
		хлорофилл b chlorophyll a chlorophyll b		каротиноид chlorophyll carotenoid
Верхушка корневища Top of rhizome	0.080 ± 0.002 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	0.020 ± 0.002 ^a	4.3 ± 0.6 ^a
Зеленеющая верхушка сармента Greening top of sarment	1.06 ± 0.01 ^b	2.2 ± 0.1 ^c	0.18 ± 0.01 ^b	6.1 ± 0.4 ^b
Молодые листья сармента Young leaves of sarment	3.36 ± 0.28 ^c	2.6 ± 0.2 ^a	0.57 ± 0.03 ^c	5.9 ± 0.2 ^b
Сформированные листья сармента Developed leaves of sarment	5.28 ± 0.58 ^d	2.6 ± 0.1 ^a	0.90 ± 0.11 ^d	5.9 ± 0.1 ^b

Примечание. Для анализа образцы зафиксированы жидким азотом; представлены среднее арифметическое значение и стандартная ошибка ($n = 5$); латинскими буквами (a, b, c, d) обозначена достоверность различий между этапами органогенеза, одинаковые буквы обозначают отсутствие достоверных различий (тест Дункана, при уровне $P < 0.05$).

Note. The rhizome and sarment samples for the analysis were frozen in liquid N₂; the averages and their standard errors are shown ($n = 5$); significant differences between organogenesis stages are indicated by Latin letters (a, b, c, d), lack of significant differences is indicated by identical letters (ANOVA *Duncan's* test, $P < 0.05$).

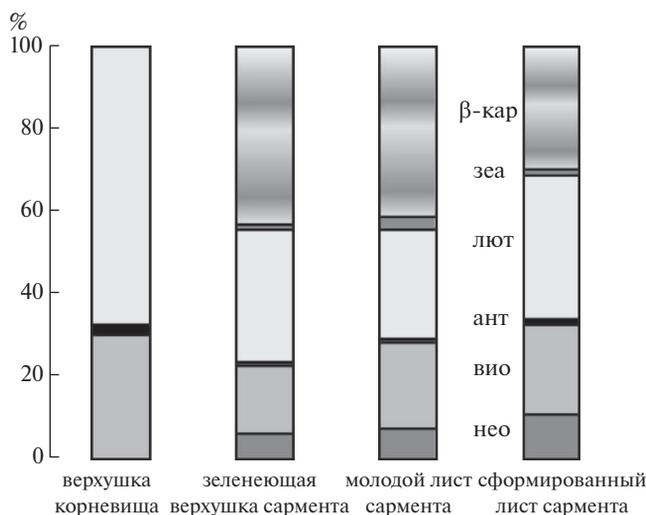


Рис. 2. Относительное содержание каротиноидов в тканях подземного побега на разных этапах его морфогенеза у растений *Achillea millefolium*. β-кар – β-каротин, зеа – зеаксантин, лют – лютеин, ант – антераксантин, вио – виолаксантин, нео – неоксантин.

Fig. 2. Relative content of carotenoids in the underground shoot tissues at different morphogenesis stages of *Achillea millefolium* plants: β-кар – β-carotene, зеа – zeaxanthine, лют – lutein, ант – antheraxanthine, вио – violaxanthine, нео – neoxanthine.

В тканях этиолированной верхушки корневищ фонд каротиноидов был представлен ксантофиллами (рис. 2). β-каротин, если и присутствовал, то в следовых количествах. Среди ксантофиллов большую часть составлял лютеин (до 70%), присутствовали компоненты виолаксантинового цикла – виолаксантин и антероксантин. На долю Вио приходилось около 30%, Ант – 2% фонда желтых пигментов. В зеленеющей верхушке сарментов состав фонда каротиноидов был богаче. Среди каротиноидов обнаружены β-каротин (43%), лютеин (32%), виолаксантин (17%), неоксантин (6%) и в небольшом количестве зеаксантин. Сформированные листья не отличались от зеленеющих верхушек по составу каротиноидов, но их соотношение менялось. В листьях заметно увеличивалась доля пигментов виолаксантинового цикла.

ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование подземных меристем – одно из важных приобретений многолетних травянистых растений в процессе их адаптивной эволюции. Подземное ветвление корневища и образование надземных ассимилирующих побегов является результатом непрерывных морфогенетических преобразований, связанных с гетерогравитропностью подземных вегетативных почек (Maslova, Golovko, 2017).

Результаты нашего исследования на модели *Achillea millefolium* выявили, что становление фотосинтетического аппарата происходит в процессе фотоморфогенеза апикальной почки подземного побега, при переходе от фотофобного к фотофильному этапу развития. Изучение фотосинтетических пигментов в верхушках подземных побегов *A. millefolium* выявило существенные различия в содержании хлорофиллов и каротиноидов в процессе фотоморфогенеза апикальной почки. В тканях верхушек корневищ обнаружены хлорофиллы и каротиноиды в низких концентрациях (табл. 3). Ультраструктурные исследования показали, что слаборазвитая мембранная система

пластид в верхушках этиолированных корневищ существенно преобразуется при переходе от фотофобного к фотофильному этапу морфогенеза. В зачатках листьев зеленеющей верхушки наблюдаются хлоропласты с развитой гранальной системой (табл. 2), существенно возрастает фонд фотосинтетических пигментов (табл. 3). Присутствие зеленых и желтых пигментов в небольшом количестве было отмечено и в этиолированных верхушках корневищ, растущих диатропно на глубине 3–7 см под поверхностью почвы. Свет низкой интенсивности может проникать на глубину 1–5 см в зависимости от типа почвы (Tester, Morris, 1987; Мо et al., 2015). Наши определения показали, что в зоне расположения основной массы корневищ освещенность может достигать 1–2 Вт/м². С другой стороны, возможен синтез хлорофиллов и в отсутствии света. Так, темновой биосинтез хлорофиллов описан для эукариот (зеленые водоросли, некоторые виды мхов и папоротников, хвойные) и покрытосеменных растений (*Hordeum vulgare*, *Tradescantia albiflora*, *Pisum sativum*) (Adamson et al., 1997). Синтез хлорофилла происходит благодаря светонезависимой протохлорофиллидоксиоредуктазе (тПОР), что определяется наличием трех хлоропластных генов (ChlB, ChlL и ChlN) (Reinbothe et al., 2010; Armstrong, 1998).

В этиолированных верхушках корневищ нами обнаружены только ксантофиллы, в основном лютеин и виолаксантин (рис. 2). По данным работы (Garmash et al., 2013), содержание лютеина в этиолированных проростках пшеницы составляло более 50% фонда каротиноидов. Считают, что при зеленении он участвует в защите слаборазвитой мембранной системы хлоропластов от фотоокисления (Baroli, Niyogi, 2000). Известна также роль лютеина как структурного пигмента (Ladygin, Shirshikova, 2006). Каротиноиды, в том числе лютеин, участвуют в сборке трубчатых элементов проламеллярных тел в этиопластах, что способствует зеленению при выходе проростков на свет (Cuttriss et al., 2007). С каротиноидами связан синтез фитогормонов (Nambara, Marion-Poll, 2005). В частности, АБК синтезируется из виолаксантина в присутствии зеаксантинэпоксидазы. Ранее нами было обнаружено повышение уровня АБК в молодых корневищах *Achillea millefolium* в период их подземного диатропного роста (Maslova et al., 2013). АБК ингибирует интенсивность транскрипции пластидных генов, подавляет накопление мРНК ядерных генов ферментов биосинтеза хлорофилла (alad, hemA1, hemA3, DCUP) (Kravtsov et al., 2011; Kuznetsov, 2018). Возможно, что накопление виолаксантина и АБК в гетеротрофных тканях корневищ способствует поддержанию диагравитропной ориентации роста верхушки корневищ.

Формирование хлоропластов с развитой гранальной системой и накопление фотосинтетических пигментов ожидаемо у зеленеющей верхушки сарментов (табл. 3, рис. 2). Тот факт, что фонд Хл *a* увеличивался в большей степени, чем Хл *b*, отражает становление фотосистем и увеличение числа реакционных центров. Накопление фотосинтетических пигментов продолжалось в формирующихся листьях сарментов. В них значительно возросло содержание зеаксантина (рис. 2), ключевого пигмента виолаксантинового цикла, участвующего в тепловой диссипации световой энергии и защите фотосинтетического аппарата от фотодеструкции (Baroli, Niyogi, 2000; Ladygin, Shirshikova, 2006; Tardy, Navaux, 1997). Функционально зрелые листья сарментов накапливали значительное количество фотосинтетических пигментов, что коррелирует с увеличением числа хлоропластов и интенсивным развитием мембранной системы в них.

Таким образом, нами впервые получены количественные данные об ультраструктурных изменениях пластид, содержании и соотношении фотосинтетических пигментов в процессе фотоморфогенеза верхушки подземного побега – сармента при переходе от диагравитропной к ортотропной ориентации роста. Выявлено преобладание ксантофиллов в фонде каротиноидов, что согласуется с представлениями об их защитной роли. Полученные данные углубляют представления о становлении фотосинтетического аппарата при переходе подземных побегов длиннокорневищных травянистых многолетников от фотофобного к фотофильному этапу развития.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны проф. Т.К. Головко за полезное обсуждение полученных результатов.

Исследования выполнены в рамках темы НИОКТР “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ АААА-А17-117033010038-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Adamson H.Y., Hiller R.G., Walmsley J. 1997. Protochlorophyllide reduction and greening in angiosperms – an evolutionary perspective. – J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 41: 201–221.

Armstrong G.A. 1998. Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. – J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 43 (2): 87–100.

[Atlas] Атлас ультраструктуры растительных тканей. 1980. Петрозаводск. 456 с.

Baroli I., Niyogi K.K. 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. – Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 355 (1402): 1385–1394.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0700>

[Bezdelev, Bezdeleva] Безделев А.Б., Безделева Т.А. 2006. Жизненные формы семенных растений российского Дальнего Востока. Владивосток. 296 с.

Cuttriss A.J., Chubb A.C., Alawady A., Grimm B., Pogson B.J. 2007. Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*. – Funct. Plant Biol. 34: 663–72.
<https://doi.org/10.1071/FP07034>

Garmash E.V., Dymova O.V., Malyshev R.V., Plyusnina S.N., Golovko T.K. 2013. Developmental changes in energy dissipation in etiolated wheat seedlings during the greening process. – Photosynthetica. 51 (4): 497–508.
<https://doi.org/10.1007/s11099-013-0044-z>

Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. 1991. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-end-capped, lightly carbon loaded C18 high performance liquid chromatographic column. – J. Chromatogr. 35: 67–78.

Kaur P., Mott I.W., Larson S.R., Bushman B.S., Hernandez A.G., Kim W.R., Liu L., Mikel M.A. 2008. Gene expression polymorphisms and ESTs associated with gravitropic response of subterranean branch meristems and growth habit in *Leumus* wildryes. – Plant Science. 175: 330–338.
<https://doi.org/10.1007/s00438-014-0817-5>

Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V. 2011. Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation. – Plant Growth Regul. 64 (2): 173–183.
<https://doi.org/10.1007/s10725-010-9553-y>

[Kuznetsov] Кузнецов В.В. 2018. Гормональная регуляция биогенеза хлоропластов. М. 112 с.

[Ladygin, Shirshikova] Ладыгин В.Г., Ширшикова Г.Н. 2006. Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот. – Журнал общей биологии. 67 (3): 163–190.

[Markarov, Golovko] Маркаров А.М., Головко Т.К. 1995а. Ростовая ориентация подземных побегов многолетних травянистых растений. 3. Морфофизиология подземных побегов и развитие сарментов. – Физиология растений. 42 (5): 709–713.

[Markarov, Golovko] Маркаров А.М., Головко Т.К. 1995б. Ростовая ориентация подземных побегов многолетних травянистых растений. 2. Влияние света на ориентацию роста корневищ и столонов. – Физиология растений. 42 (5): 533–538.

[Maslova, Golovko] Маслова С.П., Головко Т.К. 2017. Тропизмы подземных побегов – столонов и корневищ. – Журнал общей биологии. 78 (2): 47–60.
<https://doi.org/10.1134/S207908641803009X>

[Maslova et al.] Маслова С.П., Табаленкова Г.Н., Куренкова С.В., Плюснина С.Н. 2007. Сезонная динамика анатомо-морфологической структуры и содержания фитогормонов и сахаров в подземных побегах *Phalaroides arundinacea*. – Физиология растений. 54 (4): 555–561.

[Maslova et al.] Маслова С.П., Табаленкова Г.Н., Малышев Р.В., Головки Т.К. 2013. Сезонные изменения роста и метаболической активности подземных побегов тысячелистника обыкновенного. — Физиология растений. 60 (6): 865–873.
<https://doi.org/10.7868/S0015330313060079>

Mo M., Yokawa K., Baluska F. 2015. How and why do root apices sense light under the soil surface. — Front. Plant Sci. 6: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00775>

Nambara E., Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. — Ann. Rev. Plant Biol. 56: 165–185.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>

[Plyusnina et al.] Плюснина С.Н., Маслова С.П., Козырева Ю.В. 2013. Сезонные и возрастные изменения анатомической структуры подземных побегов корневищных травянистых растений. — Бот. журн. 98 (5): 596–604.
<http://elibrary.ru/item.asp?id=18971449>

Reinbothe C., Bakkouri M.E., Buhr F., Muraki N., Nomata J., Kurisu G., Fujita Y., Reinbothe S. 2010. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. — Trends in Plant Science. 15 (11): 614–624.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.002>

Ruifeng H., Min-Jeong Kim, Nelson W., Babuena T.S., Kim R., Kramer R., Crow J.A., May G.D., Thelen J.J., Soderlund C.A., Gang D.R. 2012. Next-generation sequencing-based transcriptomic and proteomic analysis of the common reed, *Phragmites australis* (Poaceae), reveals genes involved in invasiveness and rhizome specificity. — Ann. J. Bot. 99 (2): 232–247.

[Serebryakov, Serebryakova] Серебряков И.Г., Серебрякова Т.И. 1965. О двух типах формирования корневищ у травянистых многолетников. — Бюл. МОИП. Отд. биологии. 70 (1): 67–81.

Solymosi K., Schoefs B. 2010. Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. — Photosynth. Res. 105: 143–166.
<https://doi.org/10.1007/s11120-010-9568-2>

Tardy F., Havaux M. 1997. Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophylls cycle in higher-plant chloroplasts — Biochim. Biophys. Acta. 1330: 179–193.

Tester M., Morris C. 1987. The penetration of light through soil. — Plant Cell Environ. 10 (4): 281–286.

Yoshida A., Terada Y., Toriba T., Kose K., Ashikari M., Kyojuka J. 2016. Analysis of Rhizome Development in *Oryza longistaminata*, a Wild Rice Species. — Plant Cell Physiol. 57 (10): 2213–2220.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw138>

ULTRASTRUCTURE OF PLASTIDS AND PIGMENT COMPLEX IN UNDERGROUND SHOOTS OF *ACHILLEA MILLEFOLIUM* (ASTERACEAE) DURING THEIR MORPHOGENESIS

S. P. Maslova^{a, #}, O. V. Dymova^a, and S. N. Plyusnina^a

^a Institute of Biology, Komi Science Centre Ural Branch RAS
Kommunisticheskaya St., 28, Syktyvkar, Komi Republic, 167000, Russia

[#]e-mail: maslova@ibkomisc.ru

We studied the developmental changes in ultrastructure of plastids and the content of photosynthetic pigments in the apex of the *Achillea millefolium* underground shoot during its photomorphogenesis. At the photophobic stage, the system of leucoplast internal membranes in the etiolated rhizome apex contained a peripheral reticulum, single stromal thylakoids and prolamellar bodies. The HPLC analysis revealed the presence of chlorophyll and carotenoids in trace amounts. The etiolated rhizome apex contained carotenoids, the major part of which were xanthophylls, especially lutein (70%). With transition from the photophobic to photophilic stage, we found chloroplasts with a developing system of grains in the greening rhizome apex. The concentration of photosynthetic pigments in the greening rhizome apex was 1.0–1.2 mg/g DW (dry weight) which was ten times higher than that in the etiolated rhizome apex. During the greening process, the content of chlorophyll *a* increased stronger

than that of chlorophyll *b* reflecting formation of photosystems and the increasing number of the reactionary centers. The HPLC analysis revealed the presence of β -carotene, lutein, violaxanthine and zeaxanthine in the pool of carotenoids during the rhizome top greening. The rhizome leaves contained a significant amount of chlorophyll and carotenoids (5.3 mg/g of DW) that correlated with the increasing number of chloroplasts with a well-developed membrane system.

Keywords: rhizome, sarment, *Achillea millefolium*, photomorphogenesis, ultrastructure, chlorophylls, carotenoids

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Professor Tamara K. Golovko for her critical comments. The research was supported by the project “Physiology and stress tolerance of plants and poikilohydric photoautotrophs in the North” (No. AAAA-A17-117033010038-7).

REFERENCES

- Adamson, H.Y., Hiller R.G., Walmsley J. 1997. Protochlorophyllide reduction and greening in angiosperms – an evolutionary perspective. – *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 41: 201–221.
- Armstrong G.A. 1998. Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. – *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 43 (2): 87–100.
- Atlas ul'trastruktur rastitel'nykh tkanei. 1980. [Atlas of plant tissue ultrastructure] Petrozavodsk. 456 p. (In Russ.).
- Baroli I., Niyogi K.K. 2000. Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. – *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355 (1402): 1385–1394. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0700>
- Bezdelev A.B., Bezdeleva T.A. 2006. Zhiznennye formy semennykh rastenii rossiiskogo Dal'nego Vostoka [Life forms of seed plants of the Russian Far East]. Vladivostok. 296 p. (In Russ.).
- Cuttriss A.J., Chubb A.C., Alawady A., Grimm B., Pogson B.J. 2007. Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*. – *Funct. Plant Biol.* 34: 663–72. <https://doi.org/10.1071/FP07034>
- Garmash E.V., Dymova O.V., Malyshev R.V., Plyusnina S.N., Golovko T.K. 2013. Developmental changes in energy dissipation in etiolated wheat seedlings during the greening process. – *Photosynthetica*. 51 (4): 497–508. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0044-z>
- Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. 1991. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-end-capped, lightly carbon loaded C18 high performance liquid chromatographic column. – *J. Chromatogr.* 35: 67–78.
- Kaur P., Mott I.W., Larson S.R., Bushman B.S., Hernandez A.G., Kim W.R., Liu L., Mikel M.A. 2008. Gene expression polymorphisms and ESTs associated with gravitropic response of subterranean branch meristems and growth habit in *Leumus* wildryes. – *Plant Sci.* 175: 330–338. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0817-5>
- Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V. 2011. Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling deetiolation. – *Plant Growth Regul.* 64 (2): 173–183. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9553-y>
- Kuznetsov V.V. 2018. Gormonal'naya regulyatsiya biogeneza hloroplastov [Hormonal regulation of a chloroplast biogenesis]. Moscow. 112 p. (In Russ.).
- Ladygin V.G., Shirshikova G.N. 2006. The current concepts of functional role of carotenoids in the eukaryotic chloroplasts. – *Biol. Bull. Rev.* 67 (3): 163–189 (In Russ. and Engl.).
- Markarov A.M., Golovko T.K. 1995b. Growth orientation of underground shoots in perennial herbaceous plants. 2. Effect of light on rhizome and stolon growth orientation. – *Russ. J. Plant Physiol.* 42 (4): 468–472 (In Russ. and Engl.).
- Markarov A.M., Golovko T.K. 1995a. Growth orientation of underground shoots of perennial herbaceous plants: 3. Morphophysiology of underground shoots and the development of sarments. – *Russ. J. Plant Physiology.* 42 (5): 709–713 (In Russ. and Engl.).

Maslova S.P., Golovko T.K. 2018. Tropisms of Underground Shoots – Stolons and Rhizomes. – Biol. Bull. Rev. 8 (3): 181–192 (In Russ. and Engl.).
<https://doi.org/10.1134/S207908641803009X>

Maslova S.P., Tabalenkova G.N., Kurenkova S.V., Plusnina S.N. 2007. Seasonal changes in anatomical and morphological structure and the content of phytohormones and sugars in underground shoots of a long-rhizome perennial grass *Phalaroides arundinacea*. – Russ. J. Plant Physiol. 54: 491–497 (In Russ. and Engl.).

Maslova S.P., Tabalenkova G.N., Malyshev R.V., Golovko T.K. 2013. Seasonal changes of growth and metabolic activity of *Achillea millefolium* underground shoots in a cold climate. – Russ. J. Plant Physiol. 60: 821–829 (In Russ. and Engl.).

Mo M., Yokawa K., Baluska F. 2015. How and why do root apices sense light under the soil surface. – Front. Plant Sci. 6: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00775>

Nambara E., Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism – Ann. Rev. Plant Biol. 56: 165–185.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>

Plusnina S.N., Maslova S.P., Kozyreva Yu.V. Seasonal and age changes of anatomical structure in underground shoots of rhizomatous herbaceous plants. – Botanicheskii zhurnal. 98 (5): 596–604 (In Russ.).

Reinbothe C., Bakkouri M.E., Buhr F., Muraki N., Nomata J., Kurisu G., Fujita Y., Reinbothe S. 2010. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. – Trends Plant Sci. 15 (11): 614–624.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.002>

Ruifeng H., Min-Jeong Kim, Nelson W., Babuena T.S., Kim R., Kramer R., Crow J.A., May G.D., Thelen J.J., Soderlund C.A., Gang D.R. 2012. Next-generation sequencing-based transcriptomic and proteomic analysis of the common reed, *Phragmites australis* (Poaceae), reveals genes involved in invasiveness and rhizome specificity. – Ann. J. Bot. 99 (2): 232–247.

Serebryakov I.G., Serebryakova T.I. 1965. O dvukh tipakh formirovaniya kornevishch u travyanistykh mnogoletnikov [About two types of rhizomes formation at grassy perennials]. – Byul. MOIP. Otd. biologii. 70 (1): 67–81.

Solymosi K., Schoefs B. 2010. Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. – Photosynth. Res. 105: 143–166.
<https://doi.org/10.1007/s11120-010-9568-2>

Tardy F., Havaux M. 1997. Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophylls cycle in higher-plant chloroplasts. – Biochim Biophys Acta. 1330: 179–193.

Tester M., Morris C. 1987. The penetration of light through soil. – Plant Cell Environ. 10 (4): 281–286.

Yoshida A., Terada Y., Toriba T., Kose K., Ashikari M., Kyojuka J. 2016. Analysis of rhizome development in *Oryza longistaminata*, a wild rice species. – Plant Cell Physiol. 57 (10): 2213–2220.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw138>