

PRILOG METODICI IZOLACIJE ETIOPLASTA

With Summary in English

ŽIVKO STANKOVIĆ

(Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu)

Primljeno 24. 1. 1973.

Uvod

Metode za izolaciju etioplasta, tj. plastida biljaka raslih u mraku (Kirk i Tilney-Bassett 1967), znatno su manje razrađene od metoda za izolaciju hloroplasta.

Prema podacima literature izolacija etioplasta vršena je za različita istraživanja. Deo tih istraživanja odnosi se na proučavanje promena strukturne građe kada se etioplasti izlože uticaju svetlosti (Boardman i Anderson 1964, Kahn 1966, Wellburn i Wellburn 1971b), a deo na biohemijska proučavanja etioplasta u toku tih promena, na razviće fotohemijske aktivnosti u toku formiranja strukture hloroplasta (Anderson i Boardman 1964, Dodge i Whittingham 1966), na sintezu i transformaciju pigmenata, obrazovanje hlorofila (Klein i Poljakoff-Mayber 1961b), na sintezu proteina i lipida (Mego i Jagendorf 1961, Drumm i Margulies 1970), metabolizam nukleinskih kiselina (Gyldenholm 1968), dok su Price i Hirvonen (1967) odredili sedimentacione koeficijente izolovanih plastida.

Izvestan deo radova posebno se odnosi na metode izolovanja etioplasta ili pojedinih komponenti i njihovu identifikaciju, korišćenjem različitih mikroskopskih tehnika (Klein i Poljakoff-Mayber 1961a, Boardman i Wildman 1962, Orth i Cornwell 1963, Kahn 1968, Jacobson 1968, Farineau 1970, Wellburn i Wellburn 1971a, Stanković 1972).

U izolaciji plastida (a u ovom smislu i etioplasta) javljaju se izvesne poteškoće zbog specifične građe biljnog tkiva pa nema takve idealne me-

tode, koja bi ispunila sve uslove za dobijanje čistih intaktnih plastida. Dobijanje intaktnih plastida od posebnog je značaja za pojedina istraživanja. Podaci nekih istraživanja sa izolovanim hloroplastima pokazuju da je biohemijska aktivnost intaktnih bila različita od oštećenih hloroplasta (Spenser i Unt 1965, Walker 1965, Heber *et al.* 1967). Otuda je i raznovrsnost u pristupu ovom problemu, počev od izbora medijuma, načina homogenizacije tkiva, režima centrifugiranja i dr. u pojedinim istraživanjima. Stoga se može samo govoriti o manjoj ili većoj pogodnosti nekog postupka, mada se i čvrstom primenom jedne standardne metode javljaju izvesne razlike u toku rada (Ridley i Leech 1968).

Kao objekti (materijal) za izolaciju etioplasta bile su najčešće korišćene biljne vrste pasulj, nešto manje kukuruz, dok se na drugim objektima radilo znatno manje ili nije radilo nikako.

U ovom radu pristupilo se izolaciji etioplasta iz različitih biljnih vrsta sa ciljem da se utvrdi:

- 1) Pogodnost pojedinih biljaka za izolaciju etioplasta i
- 2) pogodnost medijuma za izolaciju što više intaktnih etioplasta i njihovo održavanje u datom medijumu.

Materijal i metode

Biljni materijal. Za izolaciju etioplasta u ovom radu korišćene su sledeće biljne vrste: Grašak (*Pisum sativum* L.), rotkvica (*Raphanus sativus* var. *radicula* L), suncokret (*Helianthus annuus* L), tikva (*Cucurbita pepo* L.), kukuruz (*Zea mays* L.), bob (*Vicia faba* L.), kelj pupčar (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L), gorušica (*Sinapis alba* L.), pasulj (*Phaseolus vulgaris* L.), ricinus (*Ricinus communis* L.), krastavac (*Cucumis sativus* L.), soja (*Glycine hispida* Maxim.), nosan (*Crupina vulgaris* Cass.), ovas (*Avena sativa* L.), ječam (*Hordeum sativum* Hack.) i pšenica (*Triticum vulgare* L.).

Od nabrojanih biljnih vrsta detaljnije je obrađeno pet: grašak, rotkvica, tikva, kukuruz i suncokret, dok je rad na ostalim biljnim vrstama imao samo za cilj da se dobije uvid o njihovoj pogodnosti za izolaciju etioplasta.

Gajenje biljaka. Seme pojedinih biljaka stavljano je na bubenje u destilovanoj vodi na temperaturi od 26° C u termostatu, a zatim je prenošeno u glinene posude sa vermikulitom. Biljke su gajene u mračnoj sobi na temperaturi 26 ± 1° C. Sve biljke gajene su u istim uslovima. Za izolaciju etioplasta korišćeni su etiolirani listovi ili kotiledoni biljaka različite starosti, u zavisnosti od biljne vrste i pogodnosti materijala. Najčešće su biljke bile stare 10—12 dana.

Homogenizacija. Postupak u homogenizaciji tkiva bio je isti za sav korišćeni materijal u odgovarajućem medijumu. Materijal je najpre iseckan, a zatim odmerena količina od jednog grama stavljena je u ohlađeni tarionik na 0° C, dodano 5 ml ohlađenog medijuma (2—3° C) i vršena homogenizacija sa tučkom u trajanju oko 60 sek. Nakon homogenizacije vršeno je filtriranje kroz Miracloth papir, uz blago istiskivanje usitnjenog materijala.

Medijum. Za izolaciju etioplasta korišćen je nešto modifikovan medijum Jacobsonove (1968). Polazni medijum kod svih biljnih vrsta bio je isti:

A) 0,5 M saharoza, 0,001 M $MgCl_2$, 0,2% GSA (goveđi serum-albumin, frakcija V, »Fluka«) i 0,1 M tris puffer (pH 7,4—7,8). Međutim, kako je u toku izolacije kod pojedinih materijala dolazilo do izvesnih morfoloških promena ili oštećenja etioplasta, to je sastav medijuma menjan.

Tako, pored navedenog, korišćeni su i medijumi:

- B) 0,4 M saharoza, 0,001 M $MgCl_2$, 0,2% GSA, 0,1 M tris,
C) 0,4 M saharoza, 0,001 M $MgCl_2$, 2,0% GSA, 0,1 M tris i
D) 0,6 M saharoza, 0,001 M $MgCl_2$, 0,2% GSA, 0,1 M tris.

Centrifugiranje. Izdvajanje etioplasta vršeno je diferencijalnim centrifugiranjem filtrata. Prvo centrifugiranje vršeno je na 200 g (centrifuga »Niko«, LC — 45, sa horizontalnim rotorom) u trajanju 3—5 min. Na ovaj način odstranjen je detritus, koji je sadržavao ostatke ćelijskih zidova, jedra, škrobna zrna i delimično cele i oštećene etioplaste, a supernatant je ponovo centrifugiran na 500 g (centrifuga »Tehtnica«, LC — 72, sa horizontalnim rotorom) u trajanju od 10 min. Supernatant je odliven, a talog etioplasta (u daljem tekstu etioplasti I) fino resuspendovan u 4 ml hladnog medijuma i centrifugiranje ponovljeno pri istom režimu. Ovakvim postupkom dobijen je talog etioplasta (u daljem tekstu etioplasti II) koji je korišćen za dalja istraživanja.

U zavisnosti od sastava medijuma (molaritet) i vrste materijala, u nekim slučajevima je do izvesne mere modifikovan opisani postupak.

U toku centrifugiranja temperatura se kretala od 0°C do 5°C. Da ne bi dolazilo do zagrevavanja centrifugata u toku centrifugiranja, kivete su bile izolovane od zida nosača kiveta slojem stiropora.

Variranjem jačine, vremenskog trajanja i mikroskopskom kontrolom dobijenih izolata, pri opisanom režimu centrifugiranja dobijaju se zadovoljavajući rezultati. Forsiranje dužeg ili jačeg centrifugiranja nužno povlači veće prisustvo nepoželjnih komponenta filtrata.

Svetlosno-mikroskopske metode. Za sva osnovna za-
pažanja, morfološke odlike, očuvanost, čistoću, brojnost izolovanih etioplasta i dr., kao polazni kriterijum za procenu uspeha izolacije bila su posmatranja u običnom svetlosnom, fazno-kontrastnom te fluorescentnom mikroskopu. Snimanje preparata vršeno je u fazno-kontrastnom mikroskopu.

Određivanje broja i veličine etioplasta. Broj etioplasta određivan je posle svake preparacije, tj. u filtratu, suspenziji etioplasta I i suspenziji etioplasta II, pomoću hematocitometra (komora po Neubaueru ili Bürker-Türku) i izražavan na 1 g sveže materije lista odn. kotiledona.

Određivanje veličine etioplasta vršeno je merenjem istih sa dobijenih mikrofotografija ili merenjem uzetih kontura povećane slike etioplasta sa mikrofilma na listu hartije, kao i kombinacijom ovih načina, pri poznatim uvećanjima. Za svaku biljnu vrstu vršeno je merenje preko 120 etioplasta, a dobijeni rezultati merenja prikazani su kroz distribuciju veličine etioplasta histogramima.

Elektronsko-mikroskopske metode. Talog etioplasta II uklopljen je u 1,5% agaru (Difco) u 0,1 M fosfatnom pufferu (pH 7,2—7,4) uz dodatak saharoze, čiji je molaritet odgovarao molaritetu izolacijskog medijuma. Uklopljeni etioplasti u agaru fiksirani su u 5% glutaraldehidu u trajanju od 2 sata na temperaturi od 1 do 5°C, a zatim je vršena postfiksacija 1% osmijumtetraoksidom u fosfatnom pufferu

(pH 7,2—7,4). Nakon 2-satne postfiksacije uklopljeni izolat etioplasta u agaru kratko je ispran destilovanom vodom i vršena dehidracija u seriji etanola. Komadići tkiva (kontrola) preparirani su na opisani standardni način.

Sve operacije — fiksiranje, ispiranje, postfiksacija i dehidracija — obavljane su na niskoj temperaturi (1—5° C), a uklapanje u agar i fiksacija izolata i tkiva vršeno je pri slaboj zelenoj svetlosti.

Dehidrisan materijal uklapan je u araldit (Cargille 6005).

Ultratanki prerezi načinjeni su ultramikrotomom Reichert Om U2 pomoću staklenih noževa. Kontrastiranje prereza vršeno je olovnim citratom (Reynolds 1963).

Preparati su pregledavani i snimani na Siemensovom Elmiskopu I pri 80 kV, u Institutu za biologiju Sveučilišta u Zagrebu.

Rezultati

Podaci o broju izolovanih etioplasta, prikazani na tabeli 1, pokazuju da je on bio različit kod pojedinih biljnih vrsta. Najveći broj etioplasta uspeo se izolovati iz etioliranih listova graška, a najmanji iz kotiledona suncokreta. Takođe je i broj etioplasta posle pojedinih preparacija bio različit, međutim, relativne vrednosti broja izolovanih etioplasta u odnosu na početni filtrat pokazuju približno iste vrednosti.

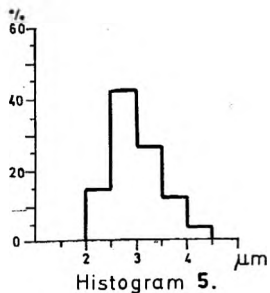
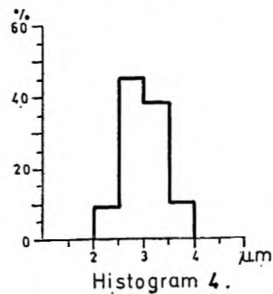
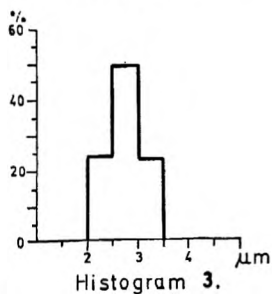
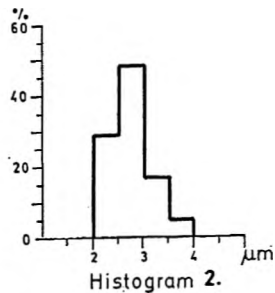
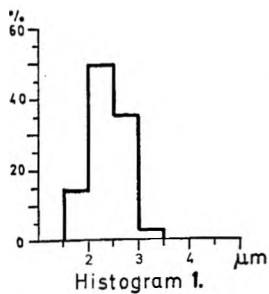
Veličina izolovanih etioplasta, kao i distribucija veličine varira kod pojedinih biljnih vrsta i kreće se od 2—2,5 μm kod rotkvice (49%), 2,5—3 μm kod tikve (52%), kukuruza (45%) i graška (49%) te 3—3,5 μm kod suncokreta, što je prikazano na histogramima 1—5.

Dobijeni rezultati svetlosno i elektronsko-mikroskopskih proučavanja pokazuju da je uspeh izolacije u pojedinim medijumima i kod pojedinih biljaka bio različit.

Tabela 1. Broj izolovanih etioplasta po 1g sveže materije lista odn. kotiledona.

Biljna vrsta	Filtrat		Etioplasti I		Etioplasti II	
	Broj	%	Broj	%	Broj	%
<i>Pisum sativum</i>	$3,3 \times 10^7$	100	$1,8 \times 10^7$	54	$1,4 \times 10^7$	42
<i>Raphanus sativus</i> var. <i>radicula</i>	$2,3 \times 10^7$	100	$1,1 \times 10^7$	48	$9,2 \times 10^6$	40
<i>Cucurbita pepo</i>	$2,0 \times 10^7$	100	$9,8 \times 10^6$	49	$7,8 \times 10^6$	39
<i>Zea mays</i>	$1,2 \times 10^7$	100	$5,9 \times 10^6$	49	$4,4 \times 10^6$	36
<i>Helianthus annuus</i>	$2,9 \times 10^6$	100	$1,5 \times 10^6$	51	$1,1 \times 10^6$	38

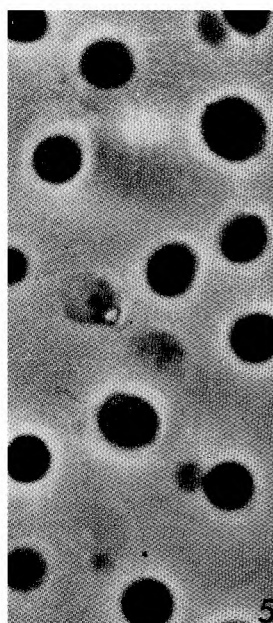
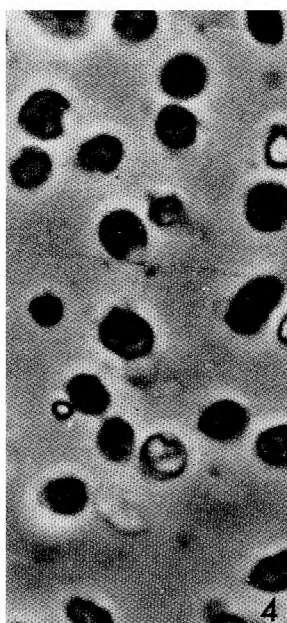
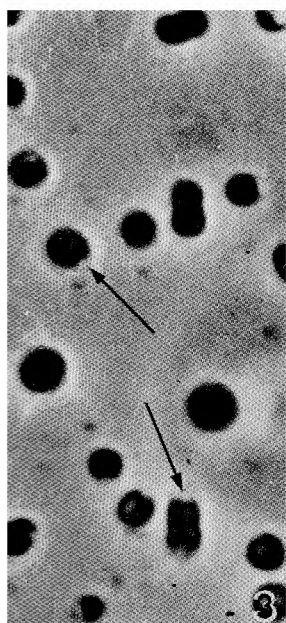
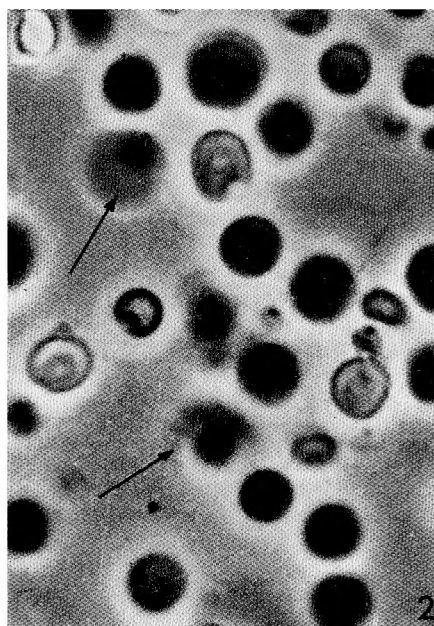
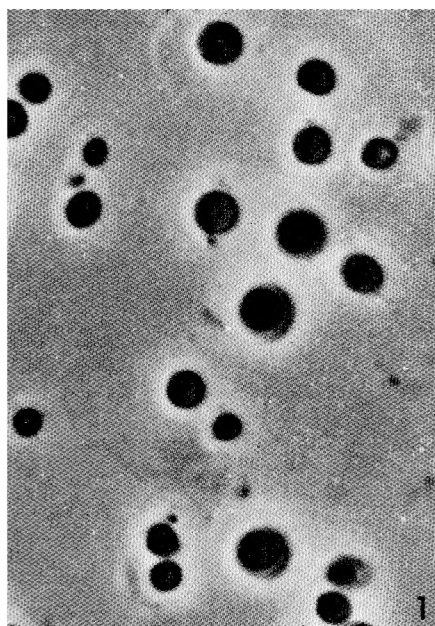
Izolovani etioplasti u medijumu A kod većine biljnih vrsta pokazuju dobru morfološku i strukturnu očuvanost. U običnom svetlosnom i fazno-kontrastnom mikroskopu etioplasti tikve (sl. 6), krastavca, nosana (sl. 1), svih žitarica (kukuruz, ovas, ječam, pšenica) te rotkvice, gorušice, suncokreta, boba i graška imaju normalan morfološki izgled sa gustom stro-



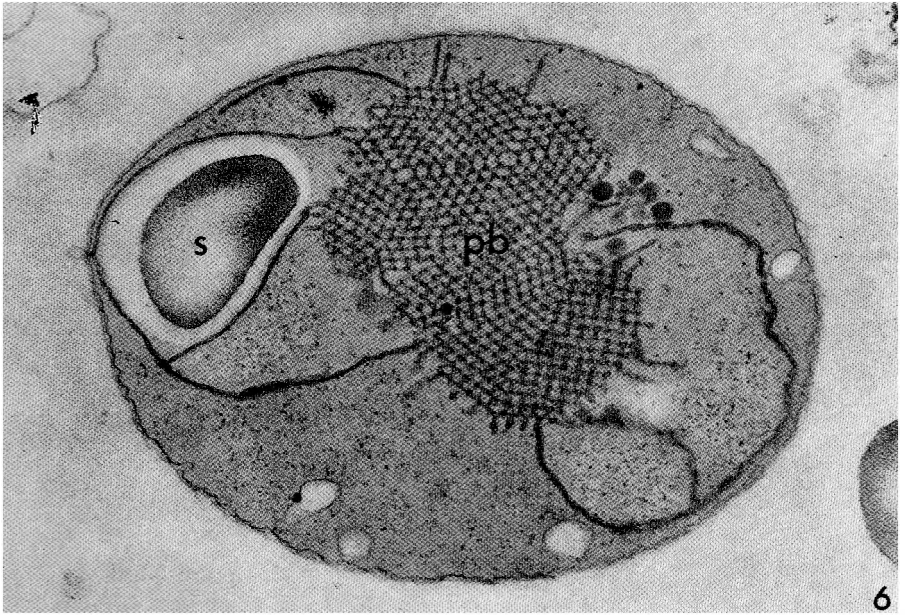
Distribucija veličine etioplasta izolovanih u medijumu A kod različitih biljnih vrsta: *Raphanus sativus* var. *radicula* — hist. 1, *Pisum sativum* — hist. 2, *Cucurbita pepo* — hist. 3, *Zea mays* — hist. 4 i *Helianthus annuus* — hist. 5.

Size distribution of the etioplasts isolated in medium A in different plants: *Raphanus sativus* var. *radicula* — Hist. 1, *Pisum sativum* — Hist. 2, *Cucurbita pepo* — Hist. 3, *Zea mays* — Hist. 4, and *Helianthus annuus* — Hist. 5.

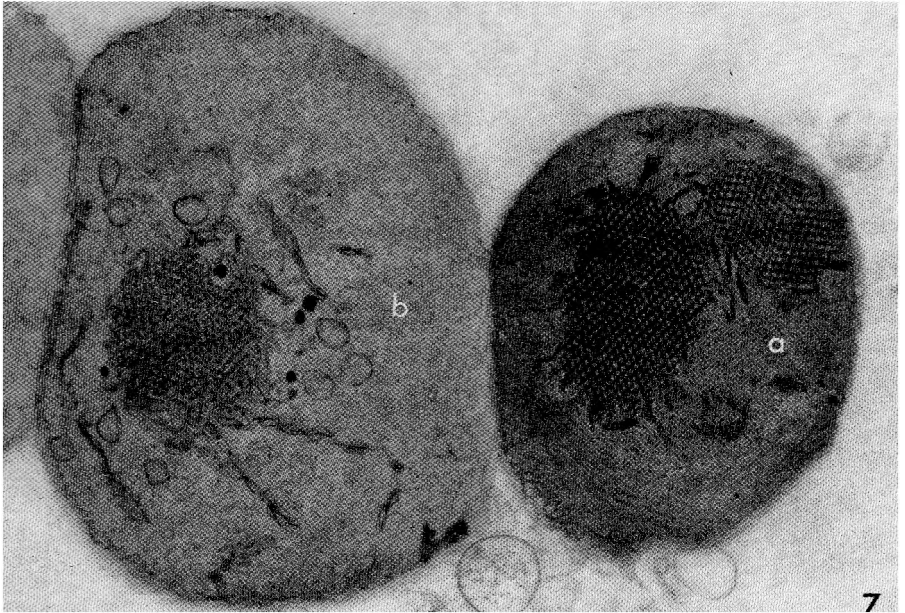
- Sl. 1. *Crupina vulgaris*. Etioplasti izolovani u medijumu A (mikrofotografija). 2 000 : 1.
 Fig. 1. *Crupina vulgaris*. Etioplasts isolated in medium A (micrograph). 2,000 : 1.
- Sl. 2. *Helianthus annuus*. Etioplasti izolovani u medijumu A. Etioplasti (strelice) sa svetlom stromom (mikrofotografija). 2 000 : 1.
 Fig. 2. *Helianthus annuus*. Etioplasts isolated in medium A. Etioplasts with light (arrows) stroma (micrograph). 2,000 : 1.
- Sl. 3. *Vicia faba*. Etioplasti izolovani u medijumu A. Etioplasti (strelice) sa vakuolama (mikrofotografija). 2 000 : 1.
 Fig. 3. *Vicia faba*. Etioplasts isolated in medium A. Etioplasts (arrows) with vacuoles (micrograph). 2,000 : 1.
- Sl. 4. *Pisum sativum*. Etioplasti izolovani u medijumu A. Izražena pojava vakuolizacije (mikrofotografija). 2 000 : 1.
 Fig. 4. *Pisum sativum*. Etioplasts isolated in medium A. The etioplasts are highly vacuolated (micrograph). 2,000 : 1.
- Sl. 5. *Pisum sativum*. Etioplasti izolovani u medijumu C (mikrofotografija). 2 000 : 1.
 Fig. 5. *Pisum sativum*. Etioplasts isolated in medium C (micrograph). 2,000 : 1.
- Sl. 6. *Cucurbita pepo*. Etioplast izolovan u medijumu A. Fina struktura etioplasta očuvana. Veliko prolamelarno telo (pb), u intaktnoj stromi skrobno zrno (s). 32 000 : 1.
 Fig. 6. *Cucurbita pepo*. Etioplast isolated in medium A. The fine structure of the etioplast is well preserved. Large prolamellar body (pb) and a starch grain (s) in the dark stroma. 32,000 : 1.
- Sl. 7. *Helianthus annuus*. Etioplasti izolovani u medijumu A sa tamnom (a) i svetlom (b) stromom. 20 000 : 1.
 Fig. 7. *Helianthus annuus*. Etioplasts isolated in medium A with dark (a) and with light (b) stroma. 20,000 : 1.
- Sl. 8. *Raphanus sativus* var. *radicula*. Etioplast izolovan u medijumu A sa velikom vakuolom. 40 000 : 1.
 Fig. 8. *Raphanus sativus* var. *radicula*. Etioplast isolated in medium A with a large vacuole. 40,000 : 1.
- Sl. 9. *Pisum sativum*. Etioplasti izolovani u medijumu B sa različitim deformacijama (strelice). 24 000 : 1.
 Fig. 9. *Pisum sativum*. Etioplasts isolated in medium B with various deformations (arrows). 24,000 : 1.
- Sl. 10. *Pisum sativum*. Etioplast izolovan u medijumu C. 32 000 : 1.
 Fig. 10. *Pisum sativum*. Etioplast isolated in medium C. 32,000 : 1.
- Sl. 11. *Helianthus annuus*. Etioplast izolovan u medijumu D. Uklopljena citoplazma (strelica). 25 000 : 1.
 Fig. 11. *Helianthus annuus*. Etioplast isolated in medium D. Cytoplasm enclosed by the etioplast (arrow). 25,000 : 1.



Sl. 1—5. — Fig. 1—5.

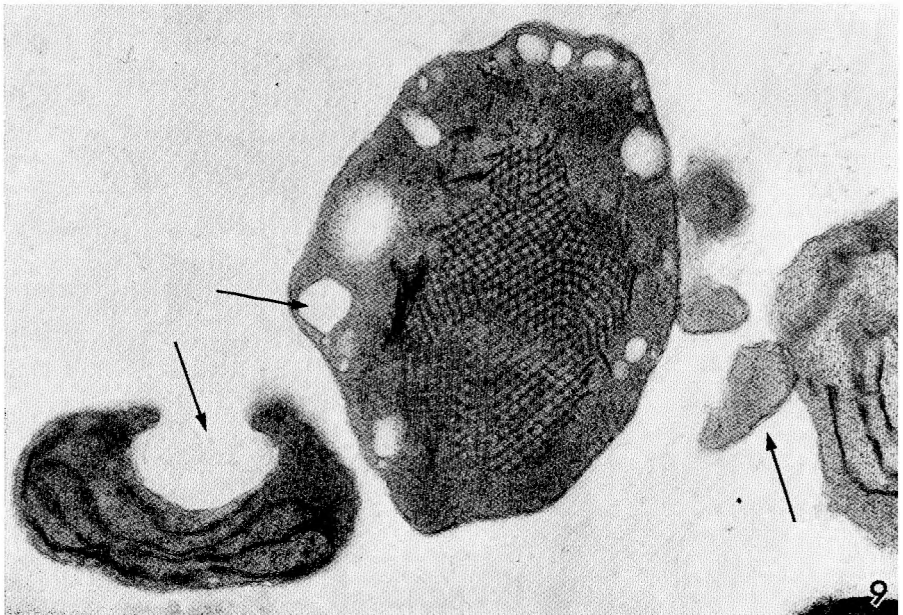
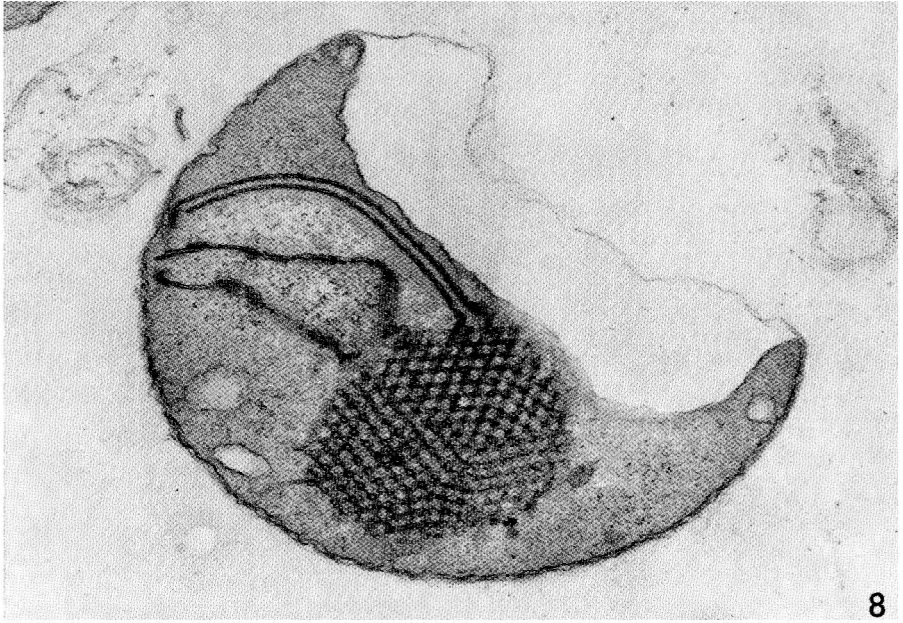


6

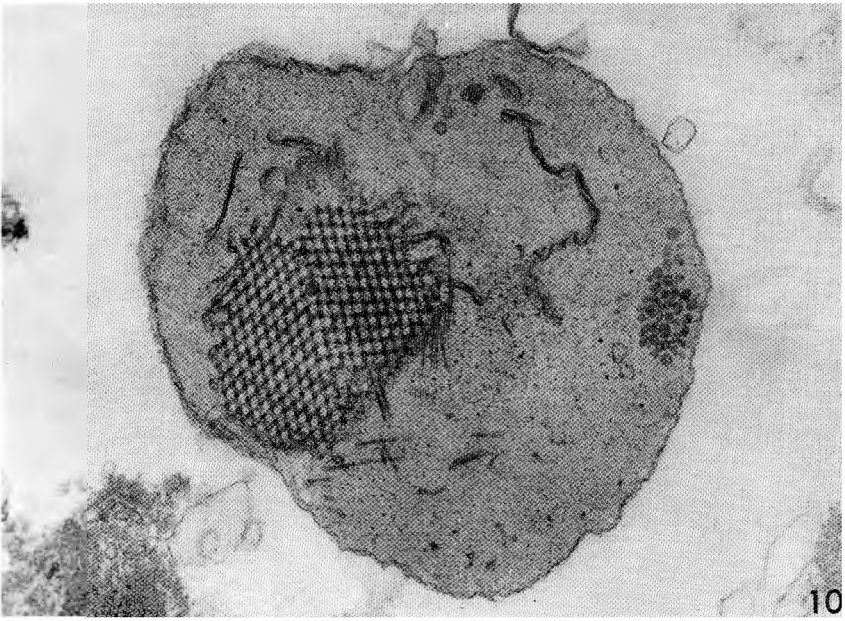


7

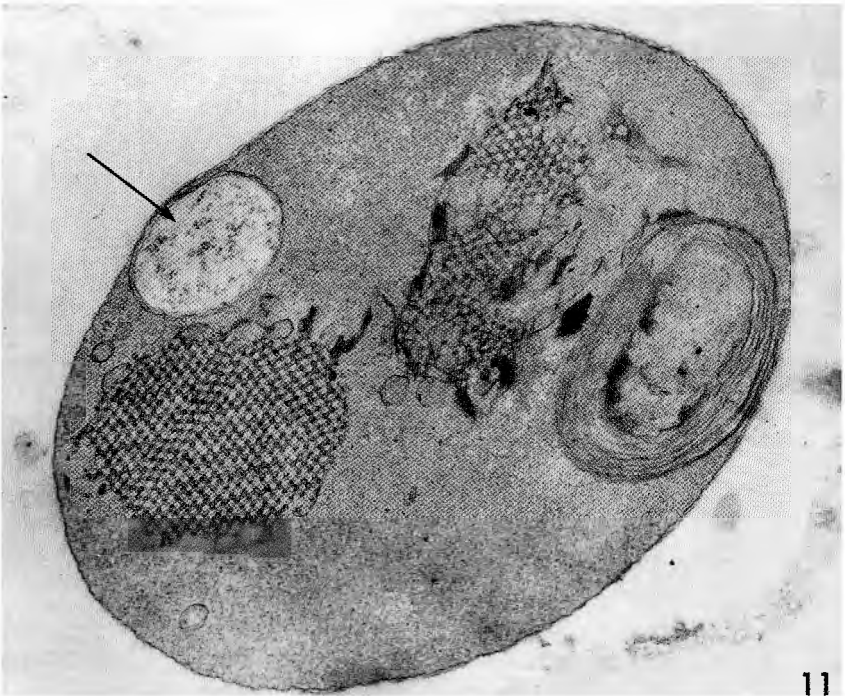
Sl. 6—7. — Fig. 6—7.



Sl. 8—9. — Fig. 8—9.



10



11

Sl. 10—11. — Fig. 10—11.

mom. Elektronsko-mikroskopska proučavanja takođe pokazuju da je fina struktura etioplasta očuvana. Etioplasti sadrže, slično onima u tkivu, prolamelarna tela, nešto tilakoida, plastoglobula, fitoferitin i gustu stromu ispunjenu brojnim ribosomima. Spoljašnja membrana etioplasta je neoštećena, intaktna (sl. 6). Međutim, u ovom medijumu kod nekih biljaka javlja se izvestan broj etioplasta koji su nabubreni ili deformisani (ameboidnog oblika). Tako kod etioplasta suncokreta dolazi do bubrenja, povećanja njihove zapremine i pojave etioplasta sa svetlom stromom (sl. 2, 7). Pojava nabubrelih etioplasta znatno je više izražena posle dužeg vremena držanja u izolacijskom medijumu. Kod etioplasta gorušice, rotkvice, boba (sl. 3) i graška kod izvesnog broja etioplasta javlja se vakuolizacija. Vakuole nastaju između spoljašnje i unutrašnje opne spoljne membrane etioplasta. Često su jako velike (sl. 8) i ispunjene tečnošću. Kod etioplasta graška, pored pojava vakuola, javljaju se i različite deformacije (sl. 4), koje su nakon dužeg stajanja izolata blaže ili sasvim nestaju.

U medijumu B vršena je izolacija etioplasta suncokreta i graška. U izolatu etioplasta suncokreta javlja se znatno veći broj oštećenih — nabubrelih etioplasta. Kod etioplasta graška javljaju se slične promene već opisanim, sa nešto izraženijom pojavom vakuolizacije i drugim deformacijama, često u vidu nastavaka (sl. 9).

Medijum C. U cilju dobijanja što više intaktnih etioplasta graška, postojećem medijumu B dodavan je 2% GSA. Izolovani etioplasti u ovom medijumu pokazivali su bolji morfološki izgled, i nakon dužeg držanja u medijumu (sl. 5), kao i strukturu (sl. 10), mada je bilo i deformisanih etioplasta.

Medijum D je korišćen za izolaciju etioplasta suncokreta. Izolacijom etioplasta u medijumu višeg molariteta postignuti su bolji rezultati, tj. dobičen je veći broj etioplasta sa očuvanom finom strukturom (sl. 11).

Izolacija etioplasta iz listova pasulja, ricinusa, soje i kelja pupčara nije dala pozitivne rezultate, bez obzira na korišćeni medijum. Posebno je bilo interesa za izolaciju etioplasta pasulja. Međutim, veliko prisustvo skrobnih zrna onemogućava izolaciju etioplasta, jer ih poput finog peska drobi, tako da se u izolatu u masi skrobnih zrna vidi tek po koji etioplast. Isti problem javlja se i u izolaciji etioplasta kelja pupčara, a kod ricinusa i soje pored skroba javlja se i povećan sadržaj ulja. Pokušaji da se koristi stariji materijal takođe su ostali bez uspeha.

Čistoća dobijenih izolata opisanim postupkom bila je različita, u zavisnosti od biljne vrste. Pri izolaciji etioplasta iz kotiledona tikve, krastavca, suncokreta, kao i iz listova graška, često se javljaju ostaci jedara. Kod izolata iz mlađeg biljnog materijala izvesne poteškoće pričinjava prisustvo skroba (grašak, tikva), a kod žitarica prisustvo ćelij-skih zidova, koji se poput iglica probijaju kroz Miracloth i prolaze u toku filtriranja homogenata.

U izolaciji etioplasta suncokreta javlja se promena boje homogenata, kao reakcija na pH sredine. Smanjenjem vrednosti pH ispod 7 boja nestaje. Verovatno da se boja javlja zbog prisustva nekih materija u kotiledonima, čija priroda nije istražena. Nakon ispiranja etioplasta I boja nestaje.

Izloženi rezultati pokazuju da je uspeh izolacije etioplasta zavisio u prvom redu od korišćenog medijuma i da bi taj problem trebalo dublje istražiti. Svakako da on zavisi znatno i od biljne vrste.

Diskusija

Izloženi rezultati pokazuju da je uspeh izolacije kod pojedinih biljnih vrsta i u različitim medijumima bio različit, te se donekle mogu uporediti sa podacima iz literature koji se odnose na problem izolacije etioplasta.

Broj izolovanih etioplasta različito je izražavan od strane pojedinih autora: po listu biljke ili na gram sveže materije. Čini se da je ovaj drugi način prihvatljiviji i da se u radu javljaju manje greške, jer mogu veličina, debljina i druge osobine lista (kotiledona) znatno varirati u okviru iste biljne vrste, a još više između različitih. Tako je G y l d e n h o l m (1968) dobio $2,1 \times 10^8$ plastida po jednom listu pasulja, a K a h n (1968) $5-7 \times 10^8$ po listu pasulja. Dobijeni podaci u ovom radu pokazuju da su relativne vrednosti izolovanih etioplasta bliske podacima iz literature (J a c o b s o n 1968, W e l l b u r n i W e l l b u r n 1971a), ali se apsolutne vrednosti dosta razlikuju. Svakako da će broj izolovanih etioplasta zavistiti od niza faktora i da je potrebno primeniti više metoda za njegovo određivanje, u cilju dobijanja pouzdanih rezultata.

Literaturni podaci o veličini etioplasta vrlo su oskudni. Prema M e g o u i J a g e n d o r f u (1961) veličina etioplasta pasulja iznosi oko 3 μ m. Dobijeni podaci u ovom radu pokazuju da je veličina etioplasta kod pojedinih biljnih vrsta bila različita, kao i da postoje izvesna variranja veličine unutar iste vrste (sl. 12, hist. 1—5). Sa dobijenih histograma može se videti da se distribucija veličine etioplasta kod biljaka sa neznačajnim brojem oštećenih (tikva) javlja u vrlo uskom intervalu, dok se kod biljaka, kod kojih su etioplasti bili deformisani (grašak, rotkvica) ili oštećeni (suncokret), distribucija veličine javlja u širem intervalu. Podaci R i d l e y a i L e e c h o v e (1968) takođe ukazuju da su oštećeni hloroplasti bili znatno krupniji u odnosu na neoštećene i da se iz dobijenih histograma može dobiti slika odnosa oštećenih i neoštećenih plastida. Na histogramu za izolovane etioplaste suncokreta (sl. 12, hist. 5) jasno se zapaža pomeranje veličine ka krupnijim etioplastima, a svetlosno-mikroskopska i elektronsko-mikroskopska istraživanja pokazuju da su ti krupniji etioplasti i oštećeni.

Za izolaciju etioplasta korišćeni su različiti medijumi od strane pojedinih autora, a svi medijumi pripremani su u vodenoj sredini. Za osmotsku stabilizaciju rastvora obično je korišćena saharoza, ređe NaCl. M e g o i J a g e n d o r f (1961) su ukazali na to da se različite kombinacije drugih komponenti (NaCl, KCl, polietilenglikol ili polivinilpirolidin sa saharoznim rastvorom, u fosfatnom ili tris puferu, sa ili bez EDTA) nisu pokazale pogodnim za izolaciju etioplasta. Isti autori smatraju da je saharozni medijum, u fosfatnom ili tris puferu, potpun kako za izolaciju tako i za ispiranje i održavanje etioplasta. U novijim radovima javljaju se i druge hemijske komponente u medijumu. Značajno mesto dato je goveđem serum-albuminu. G y l d e n h o l m i W h a t l e y (1968) su merenjem fotofosforilacije izolovanih hloroplasta, pri različitim koncentracijama GSA, utvrdili da je optimalna koncentracija za visoku aktivnost 0,25% GSA. Isti autori posebno su ukazali da pokušaji zamene GSA sa jajčanim albuminom, ili nekim drugim proteinom te amino kiselinom ne daju tako dobre rezultate. Na pozitivan efekat GSA ukazali su H o n d a et al. (1966) i drugi autori, a W e l l b u r n i W e l l b u r n (1971a) ga nazivaju »esencijelnim« za izolaciju etioplasta. Korišćenje

drugih hemijskih komponenti, često dodavanih medijumu za izolaciju hloroplasta ili drugih ćelijskih komponenti (Honda et. al. 1966) za sada nisu našle širu primenu u izolaciji etioplasta.

Prikazani rezultati pokazuju da se medijum javlja kao osnovni faktor za dobijanje intaktnih etioplasta i da je uspeh izolacije zavisio prvenstveno o korišćenom medijumu. Takođe se može videti da različite biljne vrste zahtevaju i različite medijume, tako da se ne može govoriti o nekom univerzalnom medijumu.

Prema podacima literature za izolaciju etioplasta najčešće je korišćen pasulj, a ima izvestan broj radova gde je korišćen kukuruz i nekoliko pojedinačnih radova na drugim biljnim vrstama (raž, pšenica, ovas, lan). Izloženi rezultati ovog rada ukazuju da postoji i niz drugih biljaka za izolaciju etioplasta i da su mogućnosti izbora daleko veće. Interesantan je podatak, da se u najvećem broju radova kao materijal koristio pasulj, a da su u ovom radu dobijeni negativni rezultati. Izgleda da se ovde ne radi samo o biljnoj vrsti već o specifičnoj sorti, pogodnoj za izolaciju etioplasta. Na problem izolacije etioplasta pasulja takođe su ukazali Boardman i Anderson (1964) te Gyl denholm (1968), koji su zato duže vremena gajili biljke, kako bi eliminisali skrob. Naprotiv, Drum m i Margulies (1970) su koristili vrlo mlad materijal pasulja (6—8 dana) i dobili pozitivne rezultate. Koristeći podatke ovog rada, sve biljne vrste u odnosu na pogodnost za izolaciju etioplasta mogu se svrstati u dve grupe: 1. pogodne — nosan, tikva, grašak, bob, krastavac, rotkvica, gorušica i sve žitarice i 2. nepogodne (zbog većeg sadržaja skroba) — pasulj, ricinus i kelj pupčar. Veći sadržaj ulja u biljaka (rotkvica, gorušica, suncokret, tikva) ne pričinjava znatne poteškoće u izolaciji etioplasta, jer se najvećim delom odstranjuje, nakon odlivanja supernatanta i ispiranja izolata, tako da je količina ovih primesa neznatna. Problem koji se javlja u izolaciji etioplasta graška, boba ili rotkvice (pojava vakuola i deformacija) nije odlika biljne vrste, već pogodnosti medijuma za izolaciju.

Kriterijum za procenu uspeha izolacije bila su svetlosno i elektronsko-mikroskopska proučavanja dobijenih izolata etioplasta. Elektronsko-mikroskopska zapažanja pokazuju da bitnih razlika u građi etioplasta između pojedinih biljaka nema. Etioplasti pokazuju tipičnu finu građu, koja se slaže sa podacima iz literature (Kirk i Tilney-Bassett 1967, Mühlethaler 1971). Gotovo kod svih istraživanih biljaka, manje ili više, unutrašnji sloj spoljašnje membrane stvara invaginacije u vidu tubula čineći tzv. periferni retikulum. Nakupljanje fitoferitina u stromi često se javlja u plastidima koji nisu potpuno završili svoju diferencijaciju, ili u plastidima kod kojih je na neki način ukočena fotosintetička aktivnost (Robards i Robinson 1968), kakav je slučaj i sa etioplastima.

O morfološkim promenama etioplasta i deformacijama do kojih dolazi u toku izolacije, nema dovoljno podataka u literaturi. Izvesni radovi (Leech 1966) ukazuju na neke osobenosti izolovanih hloroplasta različitim metodama. U literaturi se obično susreće pojam »oštećen« ili »razbijen« plastid. Tako su Ridley i Leech (1968) sve plastide prema morfološkoj očuvanosti podelili u tri klase: I — intaktni, II — oštećeni i III klasa — intermedijerni plastidi, tj. plastidi kod kojih je oštećena spoljašnja membrana, a ostali deo plastida je očuvan. Rezultati ovog rada o izolaciji etioplasta suncokreta mogli bi se uklopiti

u ovu podelu, dok su deformacije izolovanih etioplasta graška (sl. 4, 9) ili rotkvice (sl. 8) reverzibilne i nakon dužeg držanja u izolacijskom medijumu nestaju.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

Rezultati izolacije etioplasta kod pojedinih biljaka bili su različiti i pogodnim biljnim vrstama pokazale su se: grašak, bob, tikva, suncokret, krastavac, nosan, rotkvice, gorušica i sve žitarice, a nepogodnim: pasulj, ricinus, soja i kelj pupčar.

Najveći broj etioplasta izolovan je iz etioliranih listova graška, a najmanji iz kotiledona suncokreta (tab. 1).

Distribucija veličine etioplasta kod pojedinih biljaka bila je različita (hist. 1—5) i kreće se od: 2—2,5 μm kod rotkvice, 2,5—3 μm kod graška, tikve i kukuruza i 3—3,5 μm kod suncokreta.

Sastav medijuma pokazao se značajnim faktorom u izolaciji etioplasta. Kod većine biljaka etioplasti se mogu izolovati u medijumu A (vidi str. 71 i sl. 1, 6), međutim, ovaj medijum se pokazao manje pogodnim za izolaciju etioplasta boba (sl. 3), rotkvice (sl. 8) i suncokreta, i nepogodnim za grašak (sl. 4).

Dodavanjem stabilizirajuće komponente 2% GSA postignut je bolji rezultat u izolaciji etioplasta graška (sl. 5, 10) što ukazuje na povoljno delovanje ove komponente na stabilizaciju etioplasta.

•

Ova istraživanja započeta su u Zavodu za biologiju Univerziteta u Novom Sadu, a dovršena u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta i Institutu »Ruđer Bošković« u Zagrebu. Posebnu zahvalnost dugujem profesoru dr Zvonimiru Devidéu, rukovodiocu ovog rada i dr Mercedes Wrischer, višem naučnom suradniku Instituta »Ruđer Bošković« na sve-srdnoj pomoći u toku izrade i pisanja ovog rada.

Literatura

- Anderson, J. M. and N. K. Boardman, 1964: Studies on the greening of dark-grown bean plants. II. Development of photochemical activity. Australian J. Biol. Sci. 17, 93—101.
- Boardman, N. K. and J. M. Anderson, 1964: Studies on the greening of dark-grown bean plants. I. Formation of chloroplasts from proplastids. Australian J. Biol. Sci. 17, 86—92.
- Boardman, N. K. and S. G. Wildman, 1962: Identification of proplastids by fluorescence microscopy and their isolation and purification. Biochim. Biophys. Acta 59, 222—224.
- Dodge, A. D. and C. P. Whittingham, 1966: Photochemical activity of chloroplasts isolated from etiolated plants. Annals of Botany 30, 711—720.
- Drumm, H. E. and M. M. Margulies, 1970: *In vitro* protein synthesis by plastids of *Phaseolus vulgaris*. IV. Amino acid incorporation by etioplasts and effect of illumination of leaves on incorporation by plastids. Plant Physiol. 45, 435—442.
- Farineau, N., 1970: Sur une méthode d'isolement d'étioplastes en bon état structural, à partir de feuilles de plantules étiolées de Mais. C. R. Acad. Sci. Paris 271, 664—667.
- Gyldenholm, A. O., 1968: Macromolecular physiology of plastids. V. On the nucleic acid metabolism during chloroplast development. Hereditas 59, 142—168.

- Gyldenholm, A. O. and F. R. Whatley*, 1968: The onset of photophosphorylation in chloroplasts isolated from developing bean leaves. *New Phytol.* 67, 461—468.
- Heber, U., U. W. Hallier und M. A. Hudson*, 1967: II. Lokalisation von Enzymen des reduktiven und des oxydativen Pentose-Phosphatzyklus in den Chloroplasten und Permeabilität der Chloroplasten-Membran gegenüber Metaboliten. *Z. Naturforsch.* 22b, 1200—1215.
- Honda, S. I., T. Hongladarom and G. G. Laties*, 1966: A new isolation medium for plant organelles. *J. Exp. Bot.* 17, 460—472.
- Jacobson, A. B.*, 1968: A procedure for isolation of proplastids from etiolated maize leaves. *J. Cell Biol.* 38, 238—244.
- Kahn, A.*, 1966: Developmental physiology of bean leaf plastids. I. Preliminary studies on isolated proplastids. U: Sixth Int. Congr. Electron Microscopy, Kyoto, R. Uyeda (ed.) Maruzen Co. LTD. Tokyo Vol. 2, 381—382.
- Kahn, A.*, 1968: Developmental physiology of bean leaf plastids. II. Negative contrast electron microscopy of tubular membranes in prolamellar bodies. *Plant Physiol.* 43, 1769—1780.
- Kirk, J. T. O. and R. A. E. Tilney-Bassett*, 1967: The plastids: Their chemistry, structure, growth and inheritance. W. H. Freeman and Co., London and San Francisco.
- Klein, S. and A. Poljakoff-Mayber*, 1961a: Isolation of proplastids from etiolated bean leaves. *Exp. Cell Res.* 24, 143—145.
- Klein, S. and A. Poljakoff-Mayber*, 1961b: Fine structure and pigment conversion in isolated etiolated proplastids. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 433—440.
- Leech, R. M.*, 1966: Comparative biochemistry and comparative morphology of chloroplasts isolated by different methods. NATO Advanced Study Institute, Biochemistry of Chloroplast, Aberystwyth, 1965. T. W. Goodwin (ed.), Academic Press, London Vol. 1, 65—74.
- Mego, J. L. and A. T. Jagendorf*, 1961: Effect of light on growth of Black Valentine bean plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 53, 237—254.
- Mühlethaler, K.*, 1971: The ultrastructure of plastids. U: Structure and function of chloroplasts. M. Gibbs (ed.) Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 7—34.
- Orth, G. M. and G. D. Cornwell*, 1963: The isolation and composition of chloroplasts and etiolated plastids from corn seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 71, 734—736.
- Price, C. A. and A. P. Hirvonen*, 1967: Sedimentation rates of plastids in an analytical zonal rotor. *Biochim. Biophys. Acta* 148, 531—538.
- Reynolds, E. S.*, 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208—212.
- Ridley, S. M. and R. M. Leech*, 1968: The survival of chloroplasts *in vitro*: Particle volume distribution patterns as a criterion for assessing the degree of integrity of isolated chloroplasts. *Planta* 83, 20—34.
- Robards, A. W. and C. L. Robinson*, 1968: Further studies on phytoferritin. *Planta* 82, 179—188.
- Spenser, D. and H. Untz*, 1965: Biochemical and structural correlations in isolated spinach chloroplasts under isotonic and hypertonic conditions. *Australian J. Biol. Sci.* 18, 197—210.
- Stanković, Ž.*, 1972: Prilog metodici izolacije etioplasta. Magistarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište Zagreb.
- Walker, D. A.*, 1965: Correlation between photosynthetic activity and membrane integrity in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 40, 1157—1161.
- Wellburn, A. R. and F. A. M. Wellburn*, 1971a: A new method for isolation of etioplasts with intact envelopes. *J. Exp. Bot.* 22, 972—979.
- Wellburn, F. A. M. and A. R. Wellburn*, 1971b: Developmental changes occurring in isolated intact etioplasts. *J. Cell Sci.* 9, 271—287.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE METHOD OF ETIOPLAST ISOLATION

Živko Stanković

(Faculty of Sciences, University of Novi Sad)

In the present study an attempt has been made to find more suitable plants for etioplast isolation and to obtain a higher percentage of intact isolated etioplasts.

Etioplasts have been isolated in 16 different plant species (broad bean, pea, bean, mustard, kale, radish, cucumber, pumpkin, sunflower, castor bean, soybean, crupina, barley, maize, oat and wheat). All isolated etioplasts have been carefully observed by microscopic methods, especially by phase-contrast microscopy. In 5 plant species (pea, radish, sunflower, pumpkin and maize) the etioplasts have been investigated in detail with electron microscope. Depending on plant species the isolation of etioplasts has been attempted in different media, designated as medium A, B, C and D. The basic medium — medium A — corresponds to a slightly modified medium as used by *J a c o b s o n* (1968). The following results have been obtained:

Pea, broad bean, pumpkin, sunflower, cucumber, crupina, radish, mustard, and all cereals have proved to be suitable plants for etioplast isolation, while bean, castor bean, soybean and kale have been shown to be unsuitable.

The highest number of isolated etioplasts (Table 1) can be obtained from the etiolated leaves of pea, and the lowest one from the cotyledon of sunflower.

The size distribution of the etioplasts varies in different plants (Hist. 1—5) and ranges from 2—2.5 μm in radish, 2.5—3 μm in pea, pumpkin and maize, and 3—3.5 μm in sunflower.

The composition of the medium proved to be an important factor in the etioplast isolation. In most plants etioplasts can be successfully isolated in the medium A (see p. 71 and Figs. 1, 6); this medium, however, is less suitable for the isolation of etioplasts in broad bean (Fig. 3), radish (Fig. 8), and sunflower (Figs. 2, 7), and unsuitable in pea (Fig. 4).

Better results can be obtained in isolating etioplasts in pea (Figs. 5, 10), by adding a stabilizing component — 2% bovine serum albumin, (medium C), which indicates that this component stabilizes the structure of etioplasts.

Živko Stanković
Zavod za biologiju
Univerziteta
21 000 Novi Sad (Jugoslavija)