

MEDIJUM KAO FAKTOR ZA IZOLACIJU INTAKTNIH ETIOPLASTA*

With Summary in English

ŽIVKO STANKOVIĆ

(Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad)

Primljeno 11. 10. 1975.

Uvod

Detaljno proučavanje etioplasta počinje 1953. godine (Leyon 1953, Strugger 1953), a prvi podaci o njihovoj izolaciji i proučavanju *in vitro* javljaju se 1961. godine (Klein i Poljakoff-Mayber 1961a, b; Mego i Jagendorf 1961). Istraživanja na izolovanim etioplastima posebno su aktuelna iz razloga što se još uvek malo zna kako o njihovim strukturnim promenama tako i fiziološko-biohemijskim procesima koji se događaju u procesu formiranja strukture hloroplasta. Sa druge strane, u ovim istraživanjima javljaju se posebne poteškoće što postojeće metode za izolaciju etioplasta još uvek ne obezbeđuju mogućnost za njihovo duže održavanje *in vitro*.

Naši prethodni rezultati (Stanković 1973) pokazali su da se medijum javlja kao jedan od najznačajnijih faktora za izolaciju intaktnih etioplasta, posebno kod nekih biljnih vrsta. Radi dobijanja što je moguće više intaktnih etioplasta u ovom radu vršena su uporedna istraživanja različitih medijuma saharoze i sorbitola za izolaciju etioplasta graška, koji su do sada korišćeni kako za izolaciju etioplasta kod pojedinih biljnih vrsta, tako i za izolaciju hloroplasta.

Materijal i metode

Ponici graška (var. Mali provansalac) gajeni su u vermikulitu na 26 °C u potpunom mraku. Biljke su gajene ukupno 10 dana, a skidanje listova kao i ostale radnje obavljene su pri slabo zelenoj svetlosti i što je moguće za kraće vreme.

* Rad saopšten na II. simpozijumu Jugoslovenskog društva za biljnu fiziologiju, Stubičke Toplice, 20—23. 5. 1975.

Za izolaciju etioplasta korišćena su dva osnovna medijuma — saharozni i sorbitolni, čiji će sastav detaljnije biti prikazan u rezultatima ovog rada.

Ohlađeni listovi (c. 1 g) homogenizirani su u avanu sa tučkom uz dodatak 10 ml ohlađenog medijuma. Dobijeni homogenat filtriran je kroz dva sloja Miraclotha, prenesen u ohlađene kivete i vršeno centrifugiranje na 200 x g u trajanju od 3 min. Na ovaj način odstranjen je detritus, a supernatant ponovo centrifugiran na 500 x g u vremenu od 10 min. Supernatant je odliven, a talog etioplasta resuspendovan u 4 ml ohlađenog medijuma i centrifugiranje ponovljeno pri istom režimu. Sve operacije izvođene su na temperaturi 1—5 °C.

Mikroskopska obrada izolovanih etioplasta vršena je pomoću fazno-kontrastnog i elektronskog mikroskopa. Za elektronsko-mikroskopsku obradu dobijeni talog etioplasta uklapan je u 1,5 % agar (Jacobson 1968; Stanković 1973) u fosfatnom puferu (pH 7,2—7,4) uz dodatak saharoze ili sorbitola čiji je molaritet odgovarao molaritetu izolacijskog medijuma. Uklopljeni etioplasti u agaru fiksirani su u 5 % glutaraldehydu na 1—5 °C u trajanju od dva sata. Postfiksacija je vršena u 1 % osmiumtetroksidu u trajanju od dva sata, a zatim je vršena dehidracija u seriji etanola. Fiksirani materijal uklapan je u Epon ili araldit. Ultratanki prerezi načinjeni su ultramikrotomom Reichert Om U2, a kontrastiranje preparata vršeno je olovnim citratom (Reynolds 1963). Pregledavanje i snimanje preparata vršeno je na Siemensovom Elmiskopu I.

Rezultati

Na sl. 1 prikazana je fina građa etioplasta u listu graška gde se može videti da se ista slaže sa podacima iz literature (Kirk i Tilney-Basset 1967). Međutim, posebno se uočava razvijen periferni retikulum, a koji je uglavnom karakterističan za plastide C-4 biljaka.

Saharozni medijum. Za izolaciju etioplasta korišćeni su originalni ili nešto modifikovani medijumi prema Walker-u (1964, 1965), Stanković (1973) i dr. Najčešći sastav ovog medijuma bio je: 0,4 ili 0,5 M saharoza, 1 mM MgCl₂, 0,2% serum albumin govečeta (BSA) i 0,1 M tris odn. 0,05 M fosfatni pufer (pH 7,4—7,8). Najveći broj izolovanih etioplasta u opisanom medijumu sadrži veće ili manje vakuole (vezikule), a često i druge nastavke, a što se može videti iz prikazanih fotografija 2 i 6. Broj etioplasta bez ovih promena (sl. 7) kudikamo je manji i taj odnos, odmah nakon izolacije, često je veći od 10 : 1 u korist izmenjenim. Međutim, treba istaći da svi etioplasti imaju uglavnom dobro očuvanu spoljašnu membranu i gustu stromu.

Dodatkom 1—5 mM Na₂EDTA takvom saharoznom medijumu, kao i cisteina ili merkaptetoetanola u koncentraciji od 0,05%, tj. komponenata koje se gotovo redovno dodaju pri izolaciji hloroplasta, pojava deformacija je neznatna (sl. 3) i najveći broj etioplasta je pravilne ovalne forme. Pregledom elektronsko-mikroskopskih preparata utvrđeno je da izolovani etioplasti imaju iste karakteristike etioplasta prikazanog na sl. 6, tj. da su sa dobro očuvanom finom strukturom.

Za izolaciju etioplasta graška takođe je korišćen saharozni medijum sa dodatkom fikola (Ficol — polimer saharoze, mol. tež. c. 400000). Medijum je bio sastava: 0,4 M saharoza, 1 mM MgCl₂, 0,2% BSA, 2% ficol i 0,1 M tris pufer (pH 7,4—7,8), tj. nešto modifikovan Honda medijum (Honda et al. 1966).

Rezultati izolacije u saharozno-fikolnom medijumu pokazali su da se pored potpuno intaktnih etioplasta (sl. 8) javlja i veliki broj etioplasta sa najrazličitijim nastavcima. Pojava nastavaka naročito je izražena odmah nakon izolacije, tj. u tzv. mobilnoj pokretnoj fazi. Kasnije etioplasti dobijaju ovalnu formu, ali sa dužim držanjem u medijumu primećeno je da dolazi do njihovog slepljivanja kao i pojave nabubrenih etioplasta.

Sorbitolni medijum. Osnovni sorbitolni medijum bio je po Cockburn i sar. (1968) i sadržavao je: 0,33 M sorbitol, 5 mM $MgCl_2$ i 10 mM pirofosfatni pufer (pH 7,2—7,4), kao i sa našim modifikacijama, tj. sa dodatkom 0,2% BSA i korišćenje tris pufera. Dobijeni rezultati izolacije prikazani na sl. 4 i 9 pokazuju da su etioplasti jako nabubreni, posebno tilakoidi koji su u obliku vezikula, stroma je retka i veličina etioplasta povećana, a što se može videti iz odnosa mikrografije 9 i ostalih (6, 7 i 8). U najvećem broju izolovanih etioplasta u fazno-kontrastnom mikroskopu jasno se vide prolamelarna tela (sl. 4), što je takođe dokaz njihovog jakog bubrenja.

Međutim, ukoliko se prethodnom medijumu doda 1 mM Na_2EDTA (Mego i Jagendorf 1961; Woo et al. 1970; Whitehouse et al. 1971), svetlosno-mikroskopska istraživanja su pokazala da je pojava bubrenja retka (sl. 5) tako da etioplasti pokazuju normalan morfološki izgled, sličan onima izolovanih u saharoznom medijumu sa dodatkom EDTA (uporedi sl. 3 i 5).

Pokušaji da se etioplasti graška izoluju u nešto povećanoj koncentraciji sorbitola (0,5 M) ili u sorbitolno-fikolnom medijumu nisu dali zadovoljavajuće rezultate. U prvom slučaju pojava bubrenja je nešto smanjena, ali se javljaju slične promene opisane kod izolacije u saharoznom medijumu (vakuolizacija). U drugom slučaju, gde je dodavan fikol u svetlosnom mikroskopu, zapaža se veliki broj nastavaka, a pod elektronskim mikroskopom uočava se da su tilakoidi nabubreni i imaju izgled vezikula.

Diskusija

Poznato je da sredina u kojoj se vrši izolacija treba da bude izotonična, a njene komponente inertne u odnosu na sastav pojedinih delova etioplasta. U dosadašnjim istraživanjima za izolaciju etioplasta kao osnovna osmotska sredina korišćen je puferni rastvor saharoze, ređe NaCl. Za očuvanje nativnih svojstava etioplasta neki su autori dodavali i druge komponente, u prvom redu $MgCl_2$, a kasnije obaveznom komponentom počinje da se javlja i BSA. Osim ovih komponenti za izolaciju etioplasta druge uglavnom nisu korišćene. Možda tome doprinosi i rad Mego - a i Jagendorf - a (1961), koji su u svojim istraživanjima za izolaciju etioplasta graha ispitivali uticaj nekih soli (KCl, NaCl), visokomolekularnih jedinjenja — polietilenglikol, polivinilpirilidon, kao i nekih jona metala, i smatraju da je puferni rastvor saharoze sa dodatkom 1 mM Na_2EDTA kompletan za izolaciju etioplasta. Mada su to među prvim autorima koji su medijumu za izolaciju dodavali EDTA, u kasnijim radovima ova komponenta nije korišćena. Honda et al. (1966) za izolaciju pojedinih ćelijskih organela takođe su ispitivali veći broj komponentata, međutim, smatraju da bi efekat pojedinih od njih trebalo detaljnije istražiti. Sa druge strane Wellburn i Wellburn (1971) smatraju da medijum za izolaciju treba da bude sastavljen iz što je moguće manjeg broja komponentata, tj. jednostavniji, da se može brzo pripremiti (čime se umanjuje mogućnost kontaminacije bakterijama) i da treba imati u vidu i ekonomsku stranu. Međutim, danas se za izolaciju

plastida medijumu dodaje sve više različitih komponenata, a što u prvom redu zavisi od cilja istraživanja. Takođe je i dobrim delom utvrđen značaj pojedinih komponenti, mada se podaci više odnose za hloroplaste (O'Neal et al. 1972). Prema podacima literature dodavanje Na_2EDTA vrši se u cilju sprečavanja bubrenja ćelijskih organela, a povećava i pufernu sposobnost sistema. Ti podaci idu u prilog našim istraživanjima, jer su dobijeni bolji rezultati u izolaciji etioplasta sa dodatkom EDTA i to saharoznom i sorbitolnom medijumu.

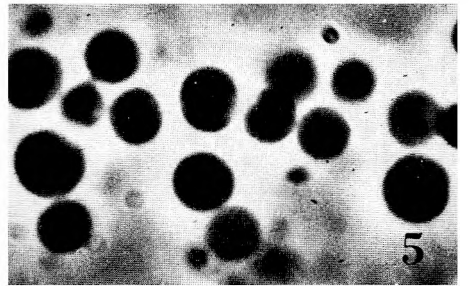
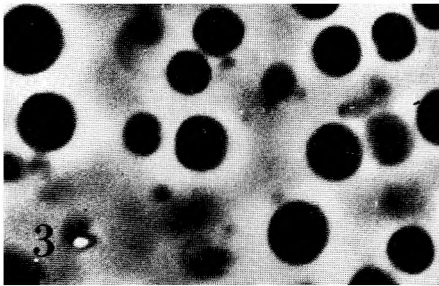
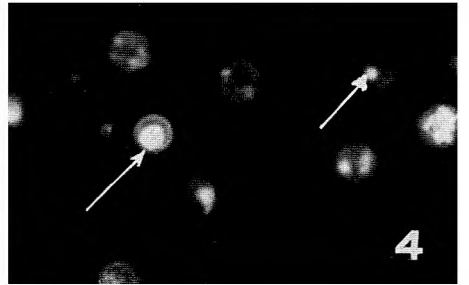
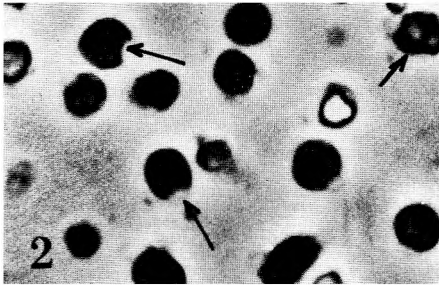
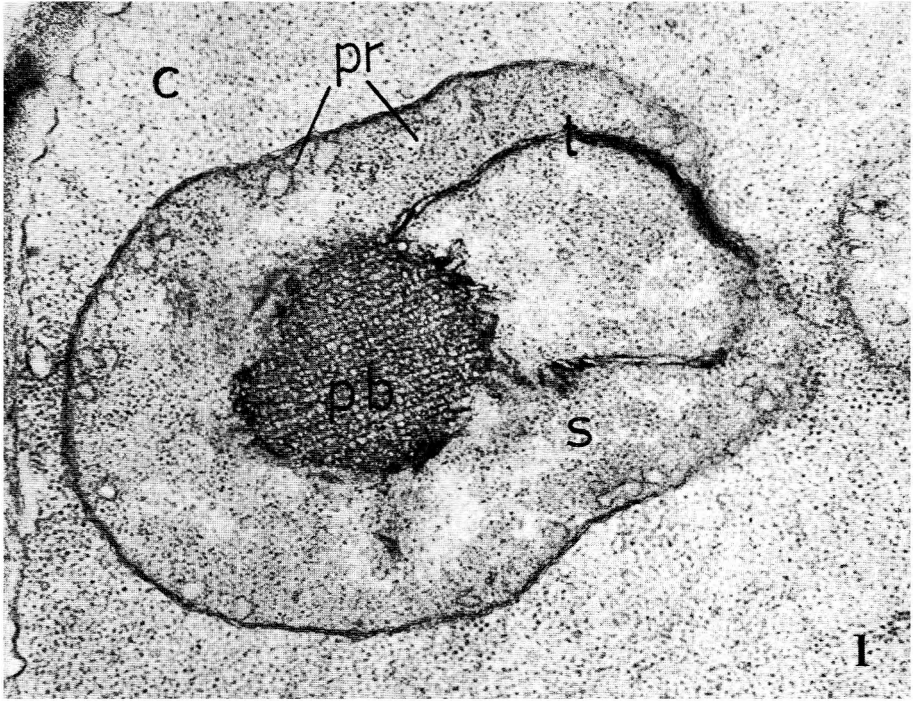
Na povoljan uticaj BSA ukazali su još Honda et al. (1966) i njegova uloga kao protektora danas se smatra esencijelnom, te se upotrebljava u izolaciji svih ćelijskih organela. I naši raniji rezultati (Stanković 1973) pokazali su da se u izolaciji etioplasta graška pri povećanim koncentracijama BSA (2,0%) dobijaju bolji rezultati, tj. povoljno se odražava na očuvanje fine strukture.

Leech (1966), Ridley i Leech (1968) za izolaciju hloroplasta koristili su se fikolom, i prema njihovim rezultatima preživljavanje i održavanje hloroplasta u medijumu sa fikolom bilo je jako dobro. Faurineau (1970) daje podatke o izolaciji etioplasta kukuruza gde se fikolom koristila za njihovo razdvajanje na gradijentu, ali ne i kao medijuma za izolaciju. Iz dobijenih podataka u našem radu teško je dati određeno mišljenje o toj komponenti jer, kao što je napred istaknuto, veliki broj izolovanih etioplasta sadržava različite nastavke. Slične promene, u gotovo identičnom medijumu, dobili su Honda et al. (1966) za hloroplaste. O stvarnoj ulozi te komponente pouzdanije bi se moglo govoriti ako bi se duže vremena pratilo održavanje etioplasta u takvom medijumu, pri čemu bi trebalo posebno videti ne doprinosi li pojava nastavaka njihovom bržem bubrenju i propadanju.

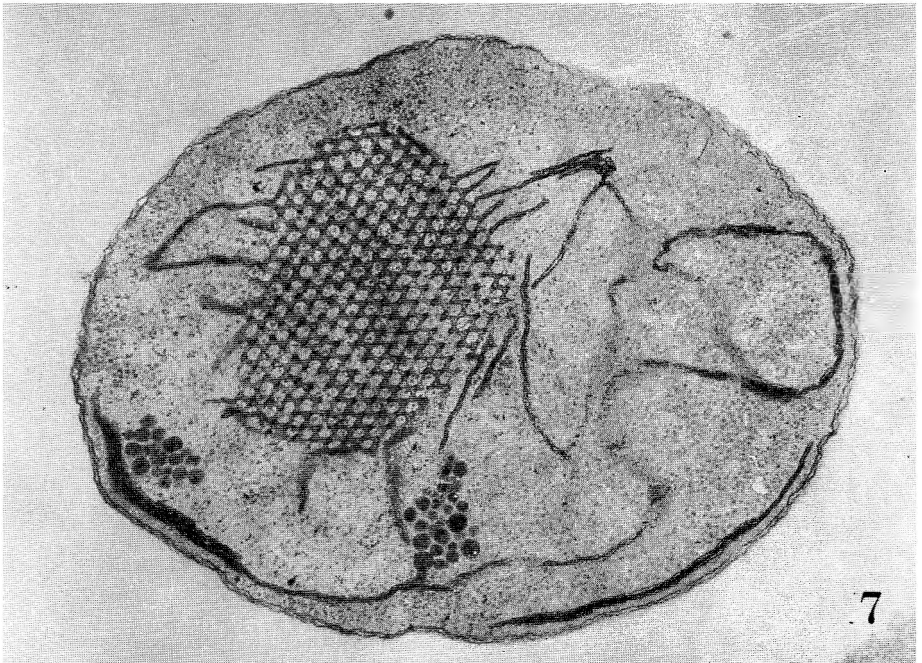
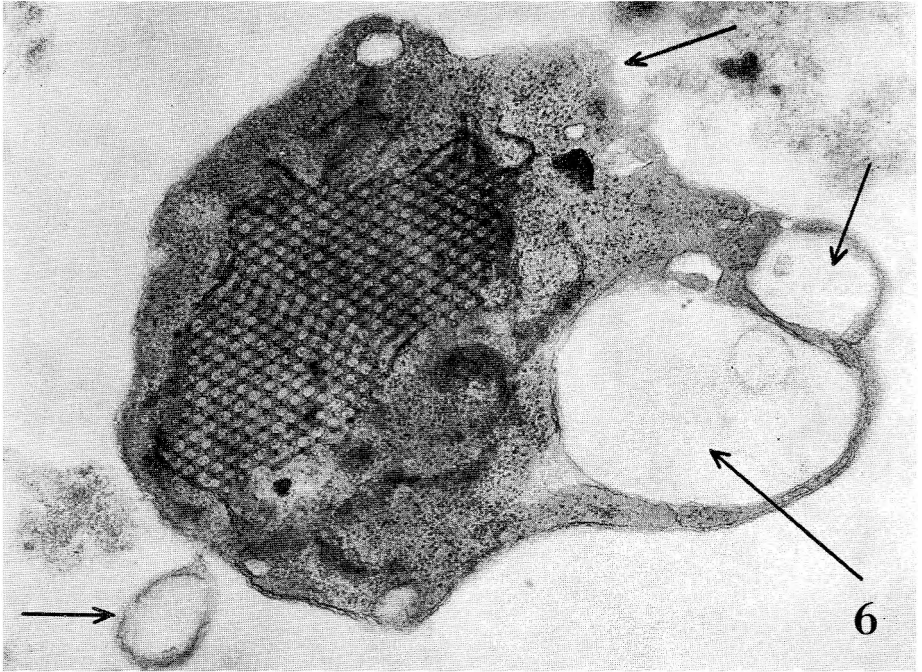
O podobnosti sorbitolnog medijuma za izolaciju etioplasta nema podataka u literaturi. Međutim, s obzirom na to da se danas za izolaciju hloroplasta gotovo isključivo koristimo sorbitolom, namera je bila da se vidi može li se taj medijum upotrebiti i za izolaciju etioplasta, što bi bio poseban doprinos. Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da se izolacija etioplasta graška može vršiti u sorbitolnom medijumu, ali je obavezno potrebno dodavati i druge komponente za stabilizaciju njihove strukture. U prvom redu to bi bile komponente koje sprečavaju proces bubrenja kao i drugih (dejstvo oksidaza i sl.). Čini se da komponente kao Na_2EDTA , cistein, merkaptoetanol ili Polyclar AT kao i druge supstance, posebno kada se etioplasti žele duže vremena da održe *in vitro*, mogu povoljno uticati.

Uobičajeno je da kada se govori o finoj građi plastida da se isti definišu kao organele ovalne forme. Međutim, na osnovu elektronsko-mikroskopskih istraživanja ovih organela *in situ* često se može videti da njihov oblik može biti vrlo različit, ali kada se ove organele nađu u drugoj sredini, odnosno medijumu obično su ovalne forme. Na osnovu naših rezultata u ovom radu čini se da su neke pojave isuviše potencirane, u prvom redu pojava vakuolizacije i nastavaka, a zatim pojava bubrenja, koje smatramo da su u prvom redu rezultat podobnosti medijuma za njihovu izolaciju. Treba istaći da postoje i druga mišljenja. Tako, Wellburn i Wellburn (1971) smatraju da pojavi vakuola (vezikula) doprinosi način izdvajanja etioplasta. Isti autori smatraju da do ovih pojava ne dolazi ako se etioplasti izdvajaju na koloni Sephadexa, dok se centrifugiranjem potenciraju. Naša proučavanja su pokazala da ovih promena ima još u početnom homogenatu, pri čemu svakako prihvatamo činjenicu da ne samo način izdvajanja već i način i brzina homogenizacije, filtriranja i drugi faktori znatno doprinose dobijanju boljih ili lošijih rezultata.

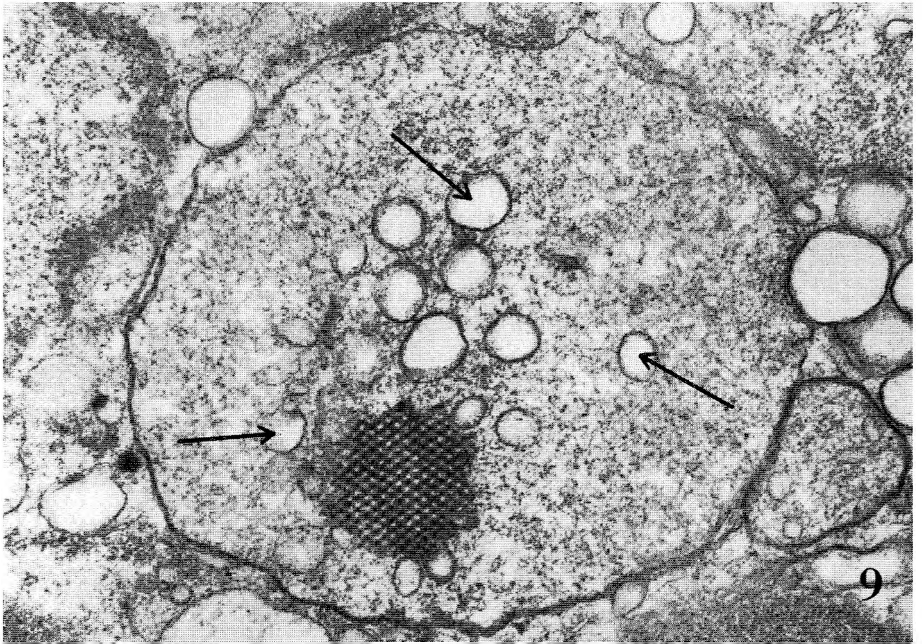
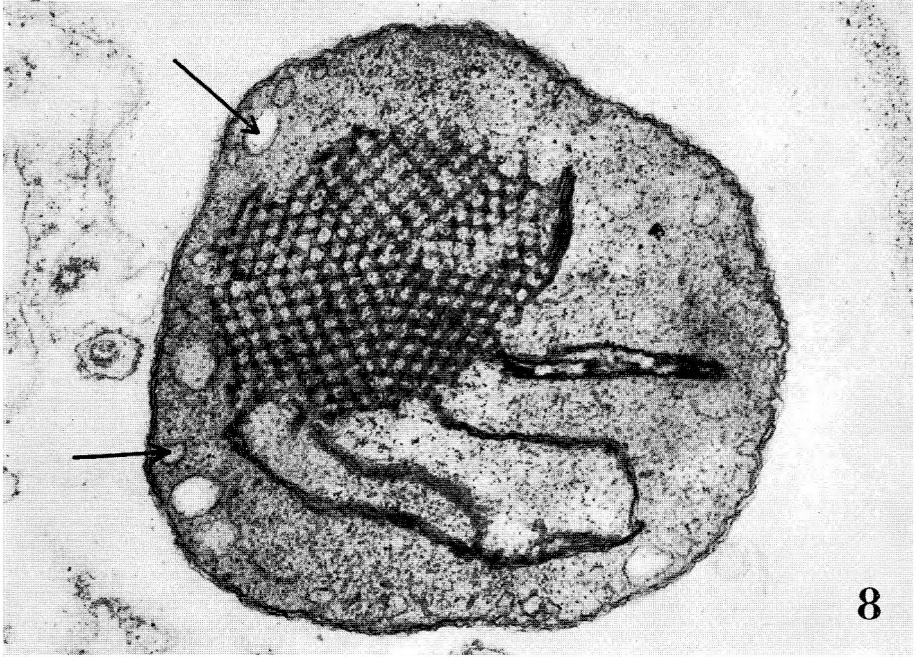
- Sl. 1. Izgled etioplasta u listu graška. U finoj građi etioplasta vidi se prolamelarno telo (pb), stroma (s), tilakoidi (t) i periferni retikulum (pr). Oko etioplasta (c) citoplazma ispunjena ribosomima. 40 000 : 1.
- Fig. 1. The appearance of etioplasts in pea leaf. In the fine structure of etioplasts there can be seen the prolamellar body (pb), stroma (s), thylakoids (t), and the peripheral reticulum (pr). Cytoplasm filled with ribosomes can be seen around the etioplasts. 40 000 : 1.
- Sl. 2. Etioplasti izolovani u saharoznom medijumu. Zapažaju se (strelice) brojne vakuole (mikrofotografija) 2000 : 1.
- Fig. 2. Etioplasts isolated in a saccharose medium. Numerous vacuoles (microphotography) can be noticed (arrows). 2000 : 1.
- Sl. 3. Etioplasti izolovani u saharoznom medijumu sa dodatkom 1 M EDTA i 0,05% merkaptotetanol (mikrofotografija) 2000 : 1.
- Fig. 3. Etioplasts isolated in a saccharose medium with the addition of 1 M EDTA and 0.05% of mercaptoethanol (microphotography). 2000 : 1.
- Sl. 4. Etioplasti izolovani u sorbitolnom medijumu (0,33 M sorbitol, 5 mM MgCl₂, 0,2% BSA i 0,1 M tris pufer. Etioplasti nabubreni sa (strelice) vidljivim prolamelarnim telašćima (mikrofotografija-anoptralkontrast). 2000 : 1.
- Fig. 4. Etioplasts isolated in a sorbitol medium (0.33 M of sorbitol, 5 mM MgCl₂, 0.2% of BSA and 0.1 M of tris buffer). Swollen etioplasts with visible prolamellar bodies (arrows) (microphotography — anoptal contrast).
- Sl. 5. Etioplasti izolovani u sorbitolnom medijumu sa dodatkom 5 mM EDTA (mikrofotografija). 2000 : 1.
- Fig. 5. Etioplasts isolated in a sorbitol medium with the addition of 5 mM of EDTA (microphotography). 2000 : 1.
- Sl. 6. Etioplast izolovan u saharoznom medijumu sa (strelice) brojnim vakuolama i nastavcima. 35 000 : 1.
- Fig. 6. Etioplast isolated in a saccharose medium with numerous vacuoles (arrows). 35 000 : 1.
- Sl. 7. Reprezentativni izgled etioplasta izolovanog u saharoznom medijumu sa očuvanom finom strukturom. 35 000 : 1.
- Fig. 7. Representative appearance of etioplast isolated in a saccharose medium with fine structure preserved. 35 000 : 1.
- Sl. 8. Etioplast izolovan u saharozno-fikolnom medijumu. Struktura etioplasta očuvana, vidi se (strelice) periferni retikulum. 43 000 : 1.
- Fig. 8. Etioplast isolated in a saccharose — ficoll medium. The structure of etioplast is preserved, the peripheral reticulum visible (arrows). 43 000 : 1.
- Sl. 9. Etioplast izolovan u sorbitolnom medijumu (prikaz sastava kod sl. 4) sa jako nabubrelim tilakoidima u obliku vezikula (strelice) i retkom stromom. 25 000 : 1.
- Fig. 9. Etioplast isolated in a sorbitol medium (for description of structure see Fig. 4.) with thylakoids considerably swollen and in the form of vesicles (arrows), and with a thin stroma. 25 000 : 1.



Sl. 1—5. — Fig. 1—5.



Sl. 6-7. — Fig. 6-7.



Sl. 8—9. — Fig. 8—9.

Konačno, treba istaći da je dobijanje intaktnih etioplasta od posebnog interesa ako se prate strukturne ili fiziološko-biohemijske promene u toku dužeg vremenskog perioda. Prema najnovijim istraživanjima *Wrischerove* (1973) održavanje etioplasta *in vitro* jedan je od limitirajućih faktora jer već posle nekoliko sati sve veći broj etioplasta propada. Imajući na umu sve napred navedeno, bilo bi svakako od interesa ispitati mogućnost održavanja i preživljavanja etioplasta u određenom medijumu, a što bi moglo da posluži kao jedan od kriterijuma za određivanje njegove podobnosti. Mora se istaći da podataka o ovakvim istraživanjima nema, a što čini poteškoće u donošenju određenih zaključaka o pogodnosti korišćenih medijuma za izolaciju etioplasta u ovom radu, te bi započeta istraživanja trebalo nastaviti.

Z a k l j u č a k

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je teško potpuno izolovati intaktne etioplaste graška. Kod najvećeg broja etioplasta izolovanih u saharoznom medijumu javljaju se manje ili veće vakuole, a često i druge promene. Etioplasti izolovani u sorbitolnom medijumu jako bubre, posebno tilakoidi, koji se javljaju u obliku vezikula.

Dotakom fikola saharoznom medijumu nije zapažena pojava vakuolizacije, ali se javlja veliki broj etioplasta sa različitim nastavcima koji vremenom nestaju. Slične promene pokazuju i etioplasti izolovani u sorbitolno-fikolnom medijumu, ali i bubrežje tilakoida.

Znatna poboljšanja u očuvanosti etioplasta postignuta su dodavanjem 1—5 M Na₂EDTA, kako saharoznom tako i sorbitolnom medijumu.

Jedan od mogućih razloga koji doprinosi opisanim promenama na izolovanim etioplastima jeste prisustvo perifernog retikuluma, koji etioplaste graška čini osetljivijim na uslove spoljne sredine.

L i t e r a t u r a

- Cockburn, W., D. A. Walker, and C. W. Baldry*, 1968: The isolation of spinach chloroplasts in pyrophosphate media. *Pl. Physiol.* 43, 1415—1418.
- Farineau, N.*, 1970: Sur une méthode d'isolement d'étioplastes en bon état structural, à partir de feuilles de plantules étioilées de Mais. *C. R. Acad. Sci. Paris* 271, 664—667.
- 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.
- 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.
- Leyon, H.*, 1953: The structure of chloroplasts. II. The first differentiation of the chloroplast structure in *Vallota* and *Taraxacum* studied by means of electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 5, 520—529.

- Mego, J. L. and A. T. Jagendorf, 1961: Effect of light on growth of Black Valentine bean plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 53, 237—254.
- O'Neal, D., C. S. Hew, E. Latzko and M. Gibbs, 1972: Photosynthetic carbon metabolism of isolated corn chloroplasts. *Plant Physiol.* 49, 607—614.
- 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.
- Stanković, Ž., 1973: Prilog metodici izolacije etioplasta. *Acta Bot. Croat.* 32, 69—80.
- Strucker, S., 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturwiss.* 37, 166—167.
- Walker, D. A., 1964: Improved rates of carbon dioxide fixation by illuminated chloroplasts. *Biochem. J.* 92, 22c—23c.
- 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, 1971: A new method for isolation of etioplasts with intact envelopes. *J. Exp. Bot.* 22, 972—979.
- Whitehouse, D. G., L. J. Ludwig and D. A. Walker, 1971: Participation of the Mehler reaction and catalase in the oxygen exchange of chloroplast preparations. *J. Exp. Bot.* 22, 772—791.
- Woo, K. C., J. M. Anderson, N. K. Boardman, W. J. S. Downton, C. B. Osmond and S. W. Thorne, 1970: Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C₄ plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 18—25.
- Wrischer, M., 1973: Ultrastructural changes in isolated plastids. I. Etioplasts. *Protoplasma* 78, 291—303.

SUMMARY

MEDIUM AS ISOLATION FACTOR FOR INTACT ETIOPLASTS

Živko Stanković

(Faculty of Science and Mathematics, Novi Sad)

This paper describes parallel investigations carried out on various media of saccharose and sorbitol used in pea etioplast isolation.

On the basis of results obtained it can be concluded that entirely etioplasts are difficult to obtain in the pea plant.

In the largest number of etioplasts isolated in a saccharose medium there occur smaller or larger vacuoles, frequently together with other changes. Etioplasts isolated in a sorbitol medium will considerably swell, particularly the thylakoids which appear in the form of vesicles.

No vacuolization was noticed after adding ficoll to the saccharose medium, but there comes forth a large number of etioplasts with various extensions, which disappear after a time. Etioplasts isolated in a sorbitol-ficoll medium show similar changes alongside the swelling of thylakoids.

Considerable improvement in the preservation of etioplasts was achieved by adding 1—5 M Na₂EDTA.

One of the possible reasons facilitating the described changes on isolated etioplasts is the presence of the peripheral reticulum, which makes the etioplasts sensitive to external conditions.