

И. А. Тиханков

АНАТОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕТЕРОБЛАСТИИ *LOLIUM PERENNE* L.

На примере *Lolium perenne* L. изучалась гетеробластия дернообразующих трав, основы которой закладываются еще в эмбриональном периоде, когда в зерновке формируется два зародышевых листа и примордий 3-го листа. Было установлено, что полностью развитые листья сильно отличаются между собой по ряду анатомо-морфологических параметров, к которым относятся площади как всего поперечного среза листа, так и его отдельных структурных элементов (паренхимы, межклетников, проводящих элементов, внешней обкладки пучков), количество проводящих пучков и хлоропластов на единицу площади. Определены анатомические признаки, которые могут стать надежными критериями количественной оценки гетеробластии. Анализ полученных данных проведен с учетом структурной неоднородности листовой пластинки и с привязкой к степени дифференциации проводящих пучков. Библиогр. 34 назв. Ил. 5. Табл. 6.

Ключевые слова: гетеробластия, морфогенез, однодольные, *Lolium perenne*, лист, примордий, ксилема, флоэма, паренхима, межклетники.

ANATOMICAL ASPECTS OF *LOLIUM PERENNE* L. HETEROBLASTY

I. A. Tikhankov

Dnipropetrovsk State University, 13, Naukova-street, Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine; 24traven@ukr.net

The turfgrass heteroblasty by the example of *Lolium perenne* L. has been investigated. It was found that adult leaves differ each from other very strongly in a range of anatomy and morphology parameters. First of all these are the square of cross sections, square and number of vascular bundles, square of mesophyll and intercellular spaces, number of chloroplasts. The sort peculiarity in these parameters has been investigated so. It was concluded that heteroblasty is genetically determined during leaf primordia formation. Some anatomy parameters, which are the most suitable for the heteroblasty estimation have been found. Refs 34. Figs 5. Tables 6.

Keywords: heteroblasty, turfgrass, cross sections, vascular bundles, bundle sheath, mesophyll, intercellular spaces, chloroplasts, leaf primordia, phloem, xylem.

Явление гетеробластии характерно для всех высших растений и проявляется как в пределах одного организма, так и на популяционном уровне. Хорошо известны особенности морфологии и физиологии низовых и верхнестебельных листьев травянистых растений [1–4], деревьев и кустарников [5–9]. Это явление обусловлено различиями в процессах морфогенеза отдельных листовых пластинок, что проявляется еще на ранних этапах индивидуального развития растений [10, 11]. Важная роль при этом отводится генетически обусловленной функциональной активности отдельных участков апикальной меристемы, которая определяет ход дальнейших морфогенетических событий и формирование архитектоники вегетативных органов [12]. Разнообразие внутренней структуры листовых пластинок закладывается еще в ходе образования примордиев, на что оказывает влияние как сама апикальная меристема, так и примордии, и листки, сформировавшиеся несколько раньше [13]. Также отмечается корреляция между морфологией листовой пластинки и характером развития других органов растения, в частности корневой системы [14]. Для некоторых растений установлены группы генов, определяющие развитие гетеробластии [15]. Кроме упомянутых внутренних факторов, на структуру листа влияют также внешние [7, 8, 16], но только в тех границах, которые определены пластичностью генома и метаболизма в целом. Гетеробластия проявляется

И. А. Тиханков (24traven@ukr.net; 24traven@email.cz): Днепропетровский национальный университет им. О. Гончара, Украина, 49050, Днепропетровск, ул. Научная 13.

не только по анатомо-морфологическим, но и по ряду физиологических параметров, таких как ростовые показатели, продолжительность жизни листьев [1]. Физиологическое значение гетеробластии не всегда находит объяснение. В этом отношении хорошо изучены древесные растения [7, 8, 17] и водные [18, 19], чего нельзя сказать о наземных травянистых растениях в целом и дернообразующих травах в частности. Особенный интерес этот вопрос приобретает в связи с тем, что первые листья злаков закладываются еще в эмбриональном периоде. Поэтому следует ожидать наибольших отличий между ними и теми листьями, чьи примордии иницируются уже в ювенильной вегетативной фазе. Генетический контроль над формированием структуры листа продолжается и на более поздних стадиях его развития [20, 21], когда задействованы не только синтетические, но и деструктивные процессы [22, 23]. Гетеробластии оценивают по строению листовых пластинок [8, 16], по физиологическим параметрам [1] или по результатам проведения некоторых простых гистохимических тестов [11]. Первый и второй варианты более приемлемы для двудольных, что связано с большим разнообразием структуры их листьев, а третий — для однодольных. При этом в зависимости от задач исследований рассматривается или как можно большее число параметров [4, 9], или ограничиваются всего несколькими определенными [15, 24]. Анатомические и цитологические параметры, хотя и используются при изучении гетеробластии [4, 14], однако нередко остаются в стороне, что в основном объясняется сложностью и продолжительностью подготовки препаратов к микроскопии. Вместе с тем именно такой подход является наиболее информативным, поскольку анализ проводится на более глубоком уровне организации растений. Кроме того, учитывая неразрывность структуры и функции, он помог бы раскрыть физиологический смысл гетеробластии.

Для изучения гетеробластии у однодольных был выбран именно райграсс (*Lolium perenne* L.), поскольку это растение является очень удобным для постановки модельных опытов. Оно неприхотливое, небольших размеров и быстро растет [25]. По сравнению с двудольными, у однодольных отсутствует вторичный рост, что наравне с продольной системой жилкования упрощает интерпретацию полученных данных.

Целью работы было изучение отличий в анатомической структуре первых трех листьев разных сортов *L. perenne* в аспекте медиа-латеральной неоднородности листовой пластинки с привязкой к степени дифференциации проводящих пучков, а также определение межсортовых различий по степени проявления гетеробластии.

Материалы и методы

Для проведения опытов было выбрано два сорта райграсса (RAPID, SAKINI) датской селекции от фирмы “Trifolium”. Семена высаживались на субстрат из универсальной грунтовой смеси с рН 5,5–6,5 с добавлением равного по объему количества песка. Опыт проводился в закрытом помещении, при постоянной температуре 23°C. Ее максимальные колебания не превышали $\pm 2^\circ\text{C}$. Освещение было естественным, с максимальной интенсивностью 1500 лк. Продолжительность светового дня не регулировалась и была такой, как в июне. Для изучения апекса и зародышевых листков семена прорастивались в чашках Петри согласно рекомендациям Ю. В. Ракина [26].

Материал для анатомических исследований отбирался из средней части листьев на 10-й день с момента их появления. Далее проводилась его фиксация в 4%-ном формальдегиде на 0,12M K₂Na-фосфатном буфере. Дальнейшее обезвоживание и заключе-

ние в Ероп осуществлялось согласно общепринятым методикам [27]. Зародыши фиксировались на 12-й, 18-й и 24-й час с момента замачивания зерновок. Их подготовка к микроскопии проводилась аналогичным образом.

Полутонкие срезы изготавливались на ультрамикротоме УМТП-4, монтировались на предметные стекла и окрашивались смесью малахитового зеленого и метилового фиолетового [28]. Дифференциация и доокраска проводились в фуксине по Моргенштерну [27]. Цитоплазма окрашивалась в фиолетово-зеленоватые тона разной интенсивности в зависимости от типа клеток, а хлоропласты становились темно-красными.

Препараты изучались под микроскопом «Биолам» с общим увеличением от 56x до 400x и фотографировались с использованием микрофотонасадки МФН-12 с поправочным коэффициентом 0,45. Изображение оцифровывалось, после чего проводились морфометрические измерения с помощью программы ImageJ. Вся площадь поперечного среза разделялась на условные зоны [29], которые определялись по контурам среза (рис. 1). Зона 1-го пучка ограничивалась линиями, которые проходили от точки характерного впячивания на абаксиальной стороне листа до точки перегиба на адаксиальной стороне. При этом в зону полностью входит большая лакуна межклетников, окружающих центральный пучок. Зона 3-го пучка ограничивалась линией, которая была перпендикулярна абаксиальной стороне листа и отделяла большую лакуну межклетников вокруг латерального пучка от паренхимы межпучковой зоны. Зона 2-го пучка ограничивалась линиями, перпендикулярными абаксиальной стороне и проходящими через точку перегиба на адаксиальной стороне листа.

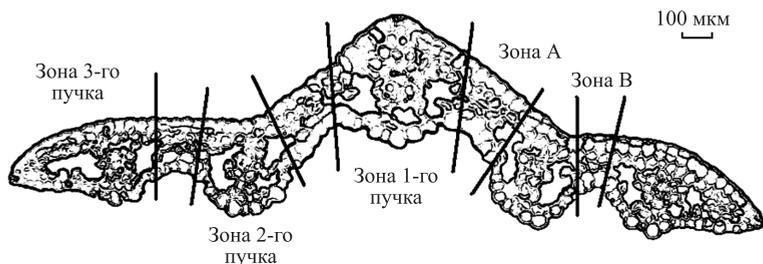


Рис. 1. Схема деления поперечного среза листовой пластинки *L. perenne* на условные зоны

Измерялась площадь всего поперечного среза, его центрального и латерального участков, межпучковой зоны, площадь проводящего пучка, его внешней обкладки, флоэмы, проводящих элементов ксилемы. На отдельных участках среза определялась площадь паренхимы, межклетников и эпидермиса, подсчитывалось количество хлоропластов на единицу площади паренхимы и обкладки пучков.

Материал отбирался с пяти наиболее характерных (по длине листьев) растений [30]. Для каждого листа готовилось 10 препаратов. Статистическая обработка включала определение среднеквадратического отклонения, среднего арифметического и коэффициента Стьюдента на 5%-ном уровне значимости [31, 32].

Результаты

Анатомический анализ зерновки *L. perenne* показал наличие двух зародышевых листьев [30]. К 12-му часу от начала набухания семян они отличались друг от друга только размерами (рис. 2). Первый лист был значительно больше второго. Каких-либо отличий по степени дифференциации тканей не было выявлено. Они появились к 24-му часу, когда в 1-м листе стали просматриваться продольные тяжи клеток с интенсивно окрашенной цитоплазмой. Во 2-м листе видимых процессов дифференциации еще не наблюдалось (рис. 3). При этом отличие между листьями по размерам

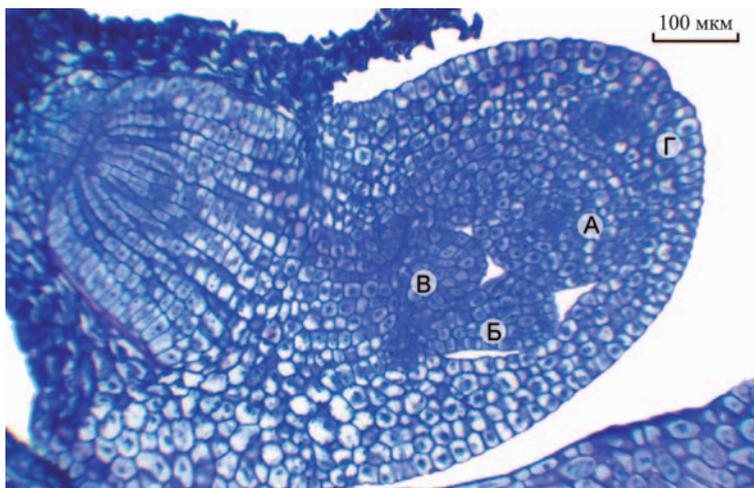


Рис. 2. Продольный срез зародыша *L. perenne* (сорт RAPID) через 12 часов после замачивания:

А — 1-й лист; Б — 2-й лист; В — апикальная меристема; Г — coleoptиль.



Рис. 3. Продольный срез апекса зародыша *L. perenne* (сорт RAPID) через 24 часа после замачивания:

А — 1-й лист; Б — 2-й лист; В — апикальная меристема.

несколько уменьшилось. Приблизительно с 18-го часа формируется примордий 3-го листа (рис. 4).

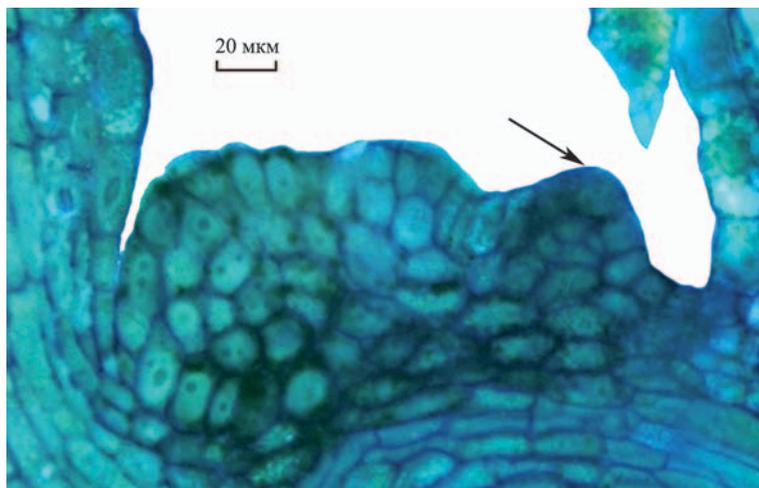


Рис. 4. Апекс зародыша *L. perenne* (сорт RAPID) через 18 часов после замачивания

Стрелкой указан примордий 3-го листа.

При изучении поперечных срезов первых трех листьев между ними обнаружались значительные отличия по форме, толщине и ширине листовой пластинки (рис. 5). У обоих сортов четко прослеживается тенденция к уменьшению угла между двумя половинками листа, разделенными центральной жилкой. Интерес представляет тот факт, что такие преобразования совпадают с характером развития проводящей системы. Как

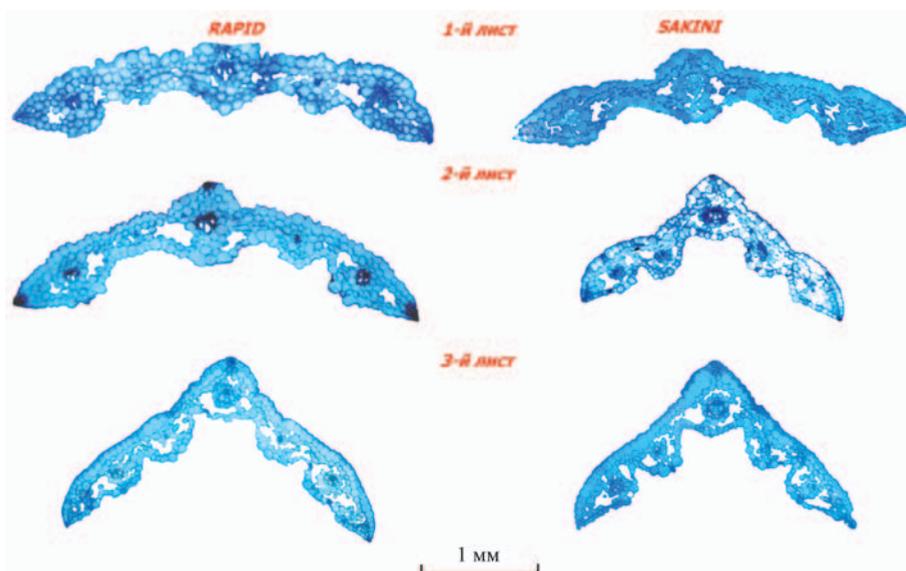


Рис. 5. Поперечные срезы первых трех листьев *L. perenne* сортов RAPID и SAKINI

правило, в листьях *L. perenne* присутствует пять проводящих пучков: центральный, или первый, два латеральных, или третьих, и два вторых пучка, находящихся между центральным и латеральными.

В 1-м листе обоих сортов 2-й пучок является наименее развитым и наименее дифференцированным. Иногда он может вообще отсутствовать в одной из половинок листа. Участок листа вокруг него также является слабо структурированным, что проявляется в отсутствии межклетников и характерного выпячивания на адаксиальной стороне листовой пластинки. Ситуация кардинально меняется в последующих листьях. Чем сильнее структурирована зона 2-го пучка, тем меньше угол между двумя половинами листа. Такие преобразования наиболее резко происходят у сорта SAKINI уже во втором листе, а у RAPID — в третьем.

Кроме того, 1-й лист обоих сортов заметно шире всех следующих, что увеличивает площадь, на которую попадают солнечные лучи. Однако при этом количество проводящих пучков у него минимально (табл. 1). У сорта SAKINI их даже четыре, а не пять. Параллельно с уменьшением ширины 2-го и 3-го листьев идет уменьшение площади всего среза (см. табл. 1), а количество проводящих пучков при этом возрастает. Следует отметить два момента: наименьшую площадь среза имеет 2-й лист; у сорта RAPID в 3-м листе в крайних латеральных зонах появляются два новых пучка, сходных по морфологии со слабо дифференцированным 2-м (рис. 5).

Таблица 1. Количественная характеристика первых трех листьев разных сортов *L. perenne*

Сорт	Порядковый номер листа	Площадь среза, мкм ²	Угол между половинами листа, град	Количество пучков на лист, шт.
RAPID	1	177282 ± 2156	133,6 ± 5,2	5
	2	128897 ± 516	113,9 ± 3,6	5
	3	136990 ± 764	80,9 ± 5,1	6–7
SAKINI	1	140307 ± 545	133,1 ± 6,3	4
	2	98429 ± 661	86,5 ± 2,4	5
	3	121850 ± 1129	78,8 ± 3,6	5

Что касается сортовых отличий, то их лучше всего характеризует тенденция изменения площади поперечного среза и угла между половинами листа с вершиной на линии центральной жилки. При переходе от 1-го листа ко 2-му площадь среза уменьшилась в 1,38 и 1,43 раза для сортов RAPID и SAKINI соответственно, а при переходе к 3-му возросла относительно 2-го в 1,06 и 1,24 раза соответственно. То есть сорт SAKINI проявляет по этому показателю больший уровень гетеробластии. Что касается величины угла, то в момент резкого перехода от одного типа листка к другому, она уменьшается в 1,41 и 1,54 раза для сортов RAPID и SAKINI соответственно. Но у SAKINI это происходит раньше. Таким образом, в определенный момент резко меняется морфология листьев: у RAPID это происходит при переходе от 2-го листа к 3-му, а у SAKINI — от 1-го ко 2-му.

Приведенные в табл. 1 данные позволяют, согласно ранее опубликованной методике [33], количественно оценить степень гетеробластии с помощью специального коэффициента — показателя гетеробластии. Для этого по конкретному параметру

проводилось сравнение листьев между собой во всех возможных парах путем взаимного деления значений этого параметра. Произведение полученных результатов является показателем гетеробластии. В соответствии с этим, по параметру площади поперечного среза показатель гетеробластии для сорта RAPID составляет 1,89, а для SAKINI — 2,04.

Дальнейший анализ анатомической структуры листьев осуществлялся по отдельным участкам (табл. 2–6) в соответствии со схемой разбивки поперечного среза на условные зоны (см. рис. 1). Такой подход объясняется как методическими трудностями в проведении морфометрии, так и разнородностью листовой пластинки в медиа-латеральном направлении. Проводящие пучки создают единый комплекс с окружающими тканями [34], и взаимосвязи в этом комплексе не могут не зависеть от степени дифференциации пучков.

Таблица 2. Количественная характеристика зоны центрального (1-го) пучка первых трех листьев *L. perenne*

Сорт	Лист	Паренхима, %	Межклетники, %	Эпидермис, %	Пучок, мкм ²	Обкладка, мкм ²	Флоэма, %	Ксилема, %	Кол-во хлоропластов паренхимы, шт. на мм ²	Кол-во хлоропластов обкладки, шт. на мм ²
RAPID	1	34,0	7,3	33,1	3710 ± 33	5606 ± 53	5,8	24,0	8301 ± 234	8741 ± 49
	2	31,2	14,0	33,2	2166 ± 5	3697 ± 18	15,2	30,5	15376 ± 402	11090 ± 189
	3	24,4	18,1	37,0	2403 ± 22	2919 ± 35	14,6	28,6	17059 ± 474	13018 ± 480
SAKINI	1	34,9	11,2	30,5	3161 ± 34	5596 ± 44	12,9	27,7	10602 ± 177	9829 ± 536
	2	24,7	16,8	38,4	1861 ± 22	2928 ± 25	15,1	29,7	18465 ± 712	16052 ± 376
	3	19,6	19,3	43,7	2176 ± 24	3267 ± 48	14,9	29,0	17866 ± 459	11019 ± 337

Примечание. Площадь паренхимы, межклетников и эпидермиса указана в процентах от площади всей зоны. Площадь проводящих элементов флоэмы и ксилемы указана в процентах от площади проводящего пучка. То же для табл. 4 и 6.

Наиболее развитым и структурированным является центральный пучок. Несколько менее дифференцирован 3-й, латеральный пучок, который имеет меньший диаметр. Кроме того, была выделена зона между 1-м и 2-м, наименее развитым пучком, которая рассматривается как участок, испытывающий наименьшее влияние транспортной системы. Он брался в качестве эталона, относительно которого анализировалось влияние степени дифференциации проводящих тканей на структуру прилегающей паренхимы.

Подсчет площади основных структурных элементов на участке центрального пучка подтвердил увеличение доли межклетников за счет уменьшения доли паренхимы в площади всей зоны (см. табл. 2), что визуально наблюдалось при малых увеличениях (см. рис. 5). Эта закономерность характерна для обоих сортов, но более значительные изменения произошли у сорта SAKINI. При переходе от 1-го листа к 3-му площадь паренхимы вокруг центрального пучка уменьшилась у RAPID в 1,39 раза, а у SAKINI — в 1,78 раза. Параллельно с этим увеличилась удельная площадь межклетников у RAPID

в 2,48 раза, а у SAKINI — в 1,72 раза. Меньший показатель по межклетникам у SAKINI объясняется тем, что у растений этого сорта более существенно возросла доля эпидермиса: у RAPID только в 1,12 раза, а у SAKINI — в 1,43 раза.

По удельной площади паренхимы вокруг центрального пучка наименьшие отличия наблюдаются между 1-м и 2-м листьями у RAPID и между 2-м и 3-м — у SAKINI. Это совпадает с большей схожестью контуров поперечных срезов соответствующих листьев у обоих сортов, на что указывалось выше. Что касается самого центрального пучка, то его абсолютная площадь изменялась пропорционально изменению площади всего среза: существенное уменьшение во 2-м листе с последующим незначительным возрастанием в 3-м. Заметных сортовых отличий кроме того, что центральный пучок у RAPID всегда больше, чем у SAKINI, не наблюдалось. Они появились при сравнении внешних обкладок (см. табл. 2). Следует также отметить, что наиболее значительные изменения площади центрального проводящего пучка наблюдались у обоих сортов при переходе от 1-го листа ко 2-му.

С повышением порядкового номера листа изменение площади паренхимы и обкладки у растений сорта RAPID происходит параллельно. У SAKINI такая закономерность для этих структур отсутствует, но проявляется в отношении пучка и его обкладки.

Особый интерес представляет характер изменения площадей проводящих элементов ксилемы и флоэмы. Их наименьшая доля в структуре центрального пучка наблюдалась в 1-м листе. В следующих листьях она значительно увеличилась, и при этом наблюдалось большее сходство между 2-м и 3-м листьями обоих сортов.

Важным показателем является количество хлоропластов на единицу площади. У сорта RAPID оно увеличивается с уменьшением площади паренхимы и обкладки и не коррелирует с изменением площади пучка. Насыщенность хлорофиллоносных тканей пластидами у сорта SAKINI варьирует с повышением порядкового номера листа несколько иначе. Обратная пропорциональная зависимость наблюдается между этим параметром в клетках обкладки и площадью центрального пучка и самой его обкладки. Что касается насыщенности хлоропластами паренхимы, то такая зависимость нарушается при переходе от 2-го листа к 3-му (см. табл. 2). Небольшое отличие по количеству пластид в этой ткани 2-го и 3-го листьев не является статистически достоверным.

Количественная оценка гетеробластии по морфологическим параметрам зоны центрального пучка приведена в табл. 3. Показатель гетеробластии по диапазону вариации конкретного признака характеризует пластичность тех генов, которые определяют развитие этого признака. Наиболее узкий диапазон вариации свойственен эпидермису и ксилеме, наиболее широкий — центральному пучку, его обкладке

Таблица 3. Показатель гетеробластии по отдельным структурным элементам зоны центрального пучка

Сорт	Паренхима	Межклетники	Эпидермис	Пучок	Обкладка	Флоэма	Ксилема	Кол-во хлоропластов паренхимы	Кол-во хлоропластов обкладки
RAPID	1,94	6,14	1,25	2,92	3,71	6,87	1,62	4,23	2,21
SAKINI	3,16	2,97	2,05	2,89	3,66	1,37	1,15	3,03	2,67

и пластидной системе, особенно паренхимы. Наибольшие сортовые отличия проявляются по межклетникам и флоэме.

На участке латерального (3-го) пучка удельная площадь паренхимы и межклетников с повышением порядкового номера листа изменялась в целом аналогично тому, что наблюдалось вокруг центрального — уменьшение площади паренхимы и увеличение площади межклетников. Однако эти изменения были очень незначительными, а иногда даже отсутствовали (табл. 4). Максимальное уменьшение доли паренхимы в структуре латерального участка составило для RAPID только 1,03 раза, а для SAKINI — 1,16 раза. Несколько большую вариабельность продемонстрировали межклетники. Их удельная площадь возросла у RAPID в 1,73 раза, а у SAKINI — в 1,59 раза. Незначительными были колебания площади эпидермиса — в 1,13 раза у RAPID и в 1,10 раза у SAKINI.

Таблица 4. Количественная характеристика зоны латерального (3-го) пучка трех листьев *L. perenne*

Сорт	Лист	Паренхима, %	Межклетники, %	Эпидермис, %	Пучок, мкм ²	Обкладка, мкм ²	Флоэма, %	Ксилема, %	Кол-во хлоропластов паренхимы, шт. на мм ²	Кол-во хлоропластов обкладки, шт. на мм ²
RAPID	1	32,1	10,3	39,5	1617 ± 10	4340 ± 82	13,1	15,0	9959 ± 351	11060 ± 277
	2	32,1	14,8	40,0	1018 ± 5	1820 ± 32	19,7	–	19384 ± 470	14286 ± 495
	3	31,3	17,8	35,3	1261 ± 10	1489 ± 50	16,4	–	15146 ± 451	14775 ± 806
SAKINI	1	33,8	10,6	40,1	1500 ± 18	3295 ± 27	10,1	23,9	15721 ± 355	9105 ± 789
	2	29,2	16,9	42,6	520 ± 6	1564 ± 24	26,9	–	18179 ± 464	16624 ± 831
	3	29,1	15,9	44,0	762 ± 5	1711 ± 14	16,9	20,1	21247 ± 413	19871 ± 935

Однако при этом в структуре самого латерального пучка и прилегающих к нему клетках обкладки происходят существенные преобразования. Они иногда более значительны по сравнению с центральным пучком, хотя общие тенденции сохраняются. Это уменьшение абсолютной площади пучка во 2-м листе по сравнению с 1-м и ее дальнейшее незначительное увеличение в 3-м. Таким же образом изменяется площадь обкладки у SAKINI, но у растений сорта RAPID она уменьшается постоянно по мере возрастания порядкового номера листка. Если уменьшение площади латерального пучка во 2-м листе растений сорта RAPID произошло в 1,59 раза с последующим его увеличением в 3-м листе в 1,24 раза, то для центрального пучка эти величины составляют 1,71 и 1,11 раза соответственно. У этого же сорта площадь обкладки латерального пучка уменьшилась в 2,92 раза, а центрального — только в 1,92 раза. Еще большая лабильность наблюдается у сорта SAKINI. Для него уменьшение площади латерального пучка во 2-м листе произошло в 2,89 раза с последующим увеличением в 3-м листе в 1,47 раза, а для центрального пучка эти величины составляют 1,70 и 1,17 раза соответственно. Площадь обкладки латерального пучка уменьшилась во 2-м листе в 2,11 раза, а центрального — в 1,91 раза. Ее последующее увеличение в 3-м листе было практически одинаковым на всех участках: в 1,10 раза вокруг 3-го пучка и в 1,12 раза вокруг 1-го.

Что касается насыщенности тканей пластидами, то на латеральном участке она, как правило, выше, чем на центральном, а у сорта SAKINI больше, чем у RAPID. Во 2-м и 3-м листьях резко возрастает количество пластид на единицу площади у обоих сортов, даже притом что, например, доля паренхимы в структуре латерального участка практически не изменяется. Негативная корреляция между площадью паренхимы и обкладки, с одной стороны, и количеством в ней пластид, с другой — в противоположность центральному участку, отсутствует. Это существенное отличие от центрального участка.

Количественная оценка гетеробластии по морфологическим параметрам зоны латерального пучка приведена в табл. 5. Из этих данных видно, насколько сильно может отличаться варибельность отдельных структур на центральном и латеральном участках у разных сортов *L. perenne*. Даже если рассматривать только один тип клеток, например паренхиму, то по параметру ее удельной площади наибольший уровень гетеробластии достигается на центральном участке, а по параметру насыщенности этой ткани хлоропластами — на латеральном.

Таблица 5. Показатель гетеробластии по отдельным структурным элементам зоны латерального пучка

Сорт	Паренхима	Межклетники	Эпидермис	Пучок	Обкладка	Флоэма	Кол-во хлоропластов паренхимы	Кол-во хлоропластов обкладки
RAPID	1,06	2,99	1,28	2,52	8,51	2,25	3,09	1,78
SAKINI	1,35	2,53	1,20	8,37	4,44	7,06	1,83	4,79

В этом аспекте представляет интерес развитие основных структур в межпучковой зоне, между 1-м и 2-м пучками (табл. 6). При сравнении зоны центрального пучка и зоны А четко проявились межсортовые отличия. Они заключаются в том, что у растений сорта RAPID наибольшие отличия по всем параметрам между 1-м и 2-м листьями обнаружались в межпучковой зоне.

Таблица 6. Количественная характеристика межпучковой зоны (зоны А) двух листьев *L. perenne*

Сорт	Лист	Паренхима, %	Межклетники, %	Эпидермис, %	Кол-во хлоропластов паренхимы, шт. на мм ²
RAPID	1	48,4	4,0	47,7	9008 ± 205
	2	33,1	12,9	54,0	19722 ± 290
SAKINI	1	32,0	10,7	57,4	13817 ± 321
	2	36,9	10,2	52,9	15542 ± 622

Так, удельная площадь паренхимы возле центрального пучка уменьшилась во 2-м листе в 1,09 раза, а в зоне А — в 1,46 раза. Удельная площадь межклетников вокруг пучка увеличилась в 1,92 раза, а в беспучковой зоне — в 3,23 раза. На центральном участке площадь эпидермиса не изменилась, а в зоне А возросла в 1,13 раза. Насыщенность паренхимы хлоропластами увеличилась в центре в 1,85 раза, а на участке без пучка — в 2,19 раза. Что касается сорта SAKINI, то в этом случае картина прямо противоположная — наибольшие отличия между листьями были зарегистрированы в зоне центрального пучка. Так, уменьшение удельной площади паренхимы вокруг 1-го пучка произошло в 1,41 раза, а в межпучковой зоне — только в 1,15 раза. Площадь межклетников и эпидермиса увеличилась в зоне центрального пучка в 1,50 и 1,26 раза, а в зоне А — в 1,05 и 1,09 раза соответственно. То же наблюдалось и в отношении насыщенности хлоропластами. Их количество на единицу площади возросло вокруг пучка в 1,74 раза, а в зоне без пучка — в 1,12 раза.

Обсуждение

О проявлении гетеробластии можно говорить с определенной осторожностью уже меньше чем через сутки после начала постэмбрионального периода онтогенеза. Осторожность при такой интерпретации обусловлена тем, что в эмбриональном периоде 1-й лист *L. perenne* закладывается раньше 2-го и поэтому несколько опережает его в своем развитии. Вместе с тем следует отметить, что 2-й лист начинает выходить из трубки только на 10-й день после того, как у большинства растений появился 1-й настоящий лист, который к этому времени завершил свое формирование и его рост практически прекратился [30]. То есть приблизительно через 1,5 недели после появления всходов разница между 1-м и 2-м листьями райграса значительно больше, чем в первые часы постэмбрионального периода. Из этого можно сделать вывод, что при прорастании зерновки могут действовать факторы, тормозящие развитие 2-го листа. В эмбриональном периоде они вероятно отсутствуют.

Различия по форме листовой пластинки между 1-м и 2-м листьями наблюдались у сорта SAKINI, когда резко изменился угол между двумя половинками листа, хотя эти листья начали формироваться в эмбриональном периоде и должны бы проявлять большее сходство, аналогично сорту RAPID. Возможно, это связано с водным и световым режимами, поскольку сорта предназначены для создания газонов в разных условиях: SAKINI — на участках с умеренным затенением, а RAPID — в глубокой тени. Чем больше согнут лист относительно центральной жилки, тем меньше попадает на его поверхность прямых солнечных лучей. Это может быть элементом защиты от избыточной освещенности и от перегрева тканей. Предназначение 1-го листа заключается в том, чтобы обеспечить быстрое развитие растения на протяжении первых 10 дней после прорастания, поскольку запасы питательных веществ в зерновке ограничены. Тогда его листовая пластинка должна быть максимально развернута для достижения большей эффективности фотосинтеза. Поскольку сорт RAPID находится в условиях глубокой затененности, то и 2-й его лист также полностью развернут. Сорт SAKINI предназначен для лучших условий освещения, и тогда достаточная интенсивность ассимиляционных процессов может быть достигнута и при такой форме листовой пластинки, когда одна половинка листа частично прикрывает другую от прямых солнечных лучей. Такое предположение подтверждается дальнейшим анализом внутренней структуры листьев,

в частности межклетников и количества хлоропластов на единицу площади паренхимы.

Вероятно, форма листа, его контуры на поперечном срезе зависят от удельной части разных структурных элементов. Это соотношение мезофилла и межклетников, что характеризует эффективность фотосинтеза, водный и газовый режим. Поскольку эти элементы формируются после закладки проводящих пучков, то последние могут играть главную роль в формировании листа. При этом, вероятно, имеет значение степень дифференциации пучков. Так, у сорта RAPID значительное изменение площади центрального пучка не совпадает по времени с существенной трансформацией контуров листа на поперечном срезе, как это имеет место у сорта SAKINI. Но у обоих сортов такая трансформация совпадает с большим развитием 2-го, наименее дифференцированного пучка. Дать полную интерпретацию корреляции между развитием транспортной системы и формой листа довольно трудно. Эти параметры скорее связаны косвенно, через взаимодействие транспортных и фотосинтетических процессов, а также, возможно, с отличиями в механических свойствах клеточных стенок абаксиальной и адаксиальной сторон листовой пластинки. Можно только констатировать, что с увеличением порядкового номера листа усиливаются транспортные процессы, в пользу чего свидетельствуют увеличение количества проводящих пучков и сильная структуризация прилегающих к ним участков.

Интерес представляет то, что в определенный момент происходит существенная перестройка морфологии и структуры листа. У обоих сортов резко изменяется форма листовой пластинки, степень структуризации листа вокруг наименее дифференцированного 2-го пучка, удельная площадь паренхимы в зоне центрального пучка. Факт этих преобразований, происходящих в разное время у каждого сорта, свидетельствует о том, что именно такая структура в наибольшей степени благоприятствует эффективности физиологических процессов у растений, предназначенных для высадки в разных условиях. То, что такие изменения происходят не постепенно, а резко: у сорта RAPID при переходе от 2-го листа к 3-му, а у сорта SAKINI — от 1-го ко 2-му, ставит вопросы, ответы на которые могут дать дальнейшие исследования.

Поскольку проводящий пучок вместе с внешней обкладкой и прилегающей паренхимой образуют структурно-функциональный комплекс [34], между его элементами должны существовать генетически определенные связи. Это подтвердилось тем, что у каждого сорта наблюдалась корреляция по характеру изменения площадей с увеличением порядкового номера листа между разными структурами в таком комплексе центральной части. Это дает возможность предположить, что у растений сорта RAPID между клетками паренхимы и обкладки центрального пучка существует более сильная функциональная связь, чем у сорта SAKINI. Такой результат можно сформулировать несколько иначе: у SAKINI функциональная связь между центральным пучком и его обкладкой сильнее, чем между обкладкой и паренхимой.

В пользу этого предположения свидетельствует также обратная зависимость между насыщенностью хлоропластами паренхимы и обкладки центрального пучка и площадью этих групп клеток у растений RAPID, тогда как у SAKINI количество пластид в этих структурных элементах изменялось разнонаправленно.

Уменьшение площади паренхимы и возрастание ее насыщенности хлоропластами с повышением порядкового номера листа свидетельствует о кардинальных изменениях в фотосинтетическом аппарате и возможном повышении эффективности ассимиляции.

онных процессов. Это согласуется с увеличением доли проводящих элементов ксилемы и флоэмы в центральном пучке, что свидетельствует об интенсификации дальнего транспорта. Хотя 1-й и 2-й листья райграса появляются еще в эмбриональном периоде, что на первый взгляд дает возможность предположить их сходство по разным показателям и в стадии зрелости, характер изменения площади ксилемы и флоэмы указывает на большее сходство между 2-м и 3-м листьями у обоих сортов. Это совпадает с полученными ранее данными, указывающими на сходство 2-го и 3-го листьев по динамике роста и их сильное отличие от 1-го листа [30].

Сравнение центральной и латеральной зон листа показало, что преобразования таких структурных элементов, как паренхима, межклетники, эпидермис вокруг менее дифференцированного 3-го пучка происходят аналогично тому, что наблюдалось вокруг 1-го пучка. Различия между зонами носят скорее количественный, но не качественный характер. Это проявилось в менее значительном изменении всех параметров зоны 3-го пучка, которые в некоторых случаях не менялись вовсе. Таким образом, на участке слабодифференцированного пучка вышерассмотренные структурные элементы демонстрируют высокую стабильность, и архитектура листа изменяется незначительно.

В противоположность этому все параметры, характеризующие структурные элементы 3-го пучка, изменялись в более широких пределах, чем у более дифференцированного 1-го пучка. Таким образом, можно констатировать большую лабильность латерального пучка по сравнению с центральным. Иными словами, латеральный пучок вносит более существенный вклад в проявление гетеробластии в целом по сравнению с центральным. При этом вклад околопучковых структур значительно больше на центральном участке. Следует отметить тот факт, что наибольшие отличия в площади латерального пучка и его обкладки наблюдаются, как и для центрального пучка с его обкладкой, между 1-м и 2-м листьями. Наименьшие отличия по этим параметрам обнаруживаются между 2-м и 3-м листьями. Таким образом, снова напрашивается вывод о связи между такими преобразованиями структуры и схожестью динамики роста 2-го и 3-го листьев [30], на что указывалось выше и что подтверждается также результатами анализа внутренней структуры латерального пучка. Это также согласуется с точкой зрения Ю. В. Гамалея [34], который рассматривает причинно-следственные связи в последовательностях: фотосинтетическая активность → флоэмный транспорт → интенсивность ростовых процессов; конечные продукты фотосинтеза → близкий транспорт → флоэмный экссудат → формы роста.

В латеральном пучке в значительных пределах варьировала удельная площадь флоэмы. Однако интерес представляет тот факт, что негативная корреляция этого параметра с площадью пучка на латеральном участке выражена сильнее, чем на центральном. Но наиболее существенные изменения произошли с ксилемой. Хорошо развитые в 1-м листе проводящие элементы этой ткани не выявлялись на поперечных срезах во 2-м и 3-м листьях, поскольку их невозможно было отличить от паренхимных клеток. Это еще одно анатомическое сходство между 2-м листом, начинающим формироваться в эмбриональном периоде, и 3-м листом, примордий которого развивается только в постэмбриональном периоде, при прорастании зерновки. То есть, несмотря на разное время закладки, эти два листа вероятно должны иметь приблизительно одинаковое физиологическое значение, отличное от 1-го листа.

Если в целом оценивать взаимосвязь отдельных структур, то можно констатировать, что на латеральном участке с менее дифференцированным проводящим пучком

все структуры проявляют большую независимость друг от друга, чем на участке центрального, сильно дифференцированного пучка. Так, например, у сорта RAPID на латеральном участке отсутствует синхронность в изменении площади паренхимы и обкладки. Известно, что системы с меньшим количеством связей более лабильны и легче выводятся из состояния равновесия под воздействием внешних факторов. Поэтому следует ожидать, что латеральный участок будет испытывать более значительные преобразования при изменении внешних условий. Для оценки степени ожидаемых изменений можно брать показатель гетеробластии. Это только предположение, и оно требует проведения дальнейших опытов.

Количественная оценка гетеробластии по отдельным зонам и параметрам может оказать существенную помощь в понимании морфогенеза и физиологии листа. Так, например, относительно паренхимы было установлено, что по параметру ее удельной площади наибольший уровень гетеробластии достигается на центральном участке, а по параметру насыщенности хлоропластами — на латеральном. Основное значение паренхимы — фотосинтез. Из полученных данных следует, что этот физиологический процесс будет протекать в разных частях листа по-разному, его эффективность может быть различной, поскольку различна организация паренхимных клеток. Отличия в этой организации могут обеспечиваться уровнем дифференциации проводящих пучков с учетом того, что структура мезофилла формируется только после закладки транспортных элементов. Исходя из этого, логично было бы связать и степень гетеробластии на отдельных участках листка с уровнем дифференциации проводящих пучков.

При анализе развития основных структур в зоне между 1-м и 2-м пучками допущено, что 2-й пучок чрезвычайно слабо дифференцирован, и поэтому его влиянием на зону А можно пренебречь. Что касается влияния сильно дифференцированного центрального пучка, то можно принять его если не нулевым, то очень слабым, учитывая расстояние до пучка. Проблема заключается в том, что в 3-м листе зона А фактически исчезает по причине сильной структуризации прилегающего ко 2-му пучку участка. Поэтому доступными для анализа остаются только два первых листа, которые начали формироваться в эмбриональном периоде. Однако этого было достаточно, чтобы выявить существенные отличия между сортами. У растений RAPID изменения в межпучковой зоне были более значительными, чем вокруг 1-го пучка. Что касается сорта SAKINI, там картина была прямо противоположной. Таким образом, сильно дифференцированный центральный пучок снижает уровень гетеробластии, но только у растений сорта RAPID.

Полученные данные согласуются с тем, что проводящий пучок образует с прилегающими структурами единую систему [34], в которой главную роль играют проводящие элементы. Поэтому именно с ними необходимо связывать физиологическое значение гетеробластии и относительно транспортной системы анализировать физиологическую роль отдельных частей листа, а также значение каждого листа в процессе индивидуального развития растений. Можно также предположить, что признаки, характеризующиеся высоким показателем гетеробластии, будут сильно варьировать под воздействием внешних факторов. Для проверки такого предположения необходима постановка двух серий опытов: с воздействием природных и абиотических факторов и с мутантными по определенным группам генов растениями.

Отличный характер изменений морфометрических показателей разных структурных элементов на разных участках листа не дает возможности сделать выводы отно-

сительно степени проявления гетеробластии в целом по растению. Целесообразность интеграционного подхода или метода разделения системы на отдельные элементы определяется конкретными целями исследования [11]. Вместе с тем оценить физиологическое состояние каждого листа можно только с использованием цитологических методов, анализируя данные по отдельным участкам с последующей интеграцией полученных результатов. Однако это уже тема дальнейших исследований.

Выводы

1. Гетеробластия четко проявляется на анатомическом уровне, а ее основы закладываются еще в эмбриональном периоде. При этом можно выделить структуры с высоким и низким уровнем вариабельности морфометрических показателей. Наименьший вклад в степень проявления гетеробластии вносят: эпидермис на всех участках листа, паренхима и межклетники латеральной зоны, проводящие элементы ксилемы центрального пучка, наибольший — площадь проводящих пучков, флоэма, паренхима и межклетники центрального участка листа.

2. Величина показателя гетеробластии зависит от медиа-латеральной неоднородности листа, которая определяется степенью дифференциации проводящих пучков. Так, на участке вокруг сильно дифференцированного центрального проводящего пучка уровень гетеробластии по параметру площади межклетников, паренхимы и насыщенности ее клеток хлоропластами выше, чем на участке вокруг менее дифференцированного латерального (3-го) пучка, но меньше по параметру площади внешней обкладки.

3. Показатель гетеробластии может характеризовать сортовые отличия, что подчеркивает ее генетическую обусловленность. При этом наиболее сильно отличия между сортами проявляются на латеральном участке по количеству хлоропластов на единицу площади всех хлорофиллоносных тканей и параметрам, связанным с проводящей системой, — площади пучка, его обкладки, флоэмы, проводящих элементов ксилемы. На центральном участке наиболее значительные сортовые отличия проявляются по площади структур, окружающих проводящий пучок, — межклетников и паренхимы.

4. Наиболее простыми критериями для количественной оценки гетеробластии при экспресс-анализе являются площадь поперечного среза и количество проводящих пучков. Более детальный анализ необходимо вести по отдельным параметрам, выбор которых зависит от конкретно поставленной задачи. В первую очередь, это площади основных структурных элементов — паренхимы, межклетников, проводящих пучков, флоэмы, ксилемы, а также количество хлоропластов на единицу площади паренхимы.

5. Гетеробластия, вероятно, связана с разными этапами индивидуального развития растений. Возможно, что листья с определенной структурой оптимально обеспечивают протекание того или иного физиологического процесса, определяющего дальнейшую судьбу растения.

Литература

1. Кондратьева-Мельвилль Е. А. Ярусная изменчивость листьев в онтогенезе однолетнего двудольного растения // Бот. журн. 1980. № 8. С. 1113–1119.
2. Эзау К. Анатомия семенных растений. М., 1980. 558 с.

3. Taylor Z. Management of axillary shoot growth and maleic hydrazide residues with diflufenzopyr in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum*) // Thesis for the Degree of Master of Science. Raleigh, NC, 2005. 55 p. URL: <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/1502> (дата обращения: 27.10.2013).
4. Очирова К. С. Структурная адаптация полыней к условиям Калмыкии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2010. 19 с.
5. Васильев Б. П., Паутов А. А. О строении годичного побега *Populus alba* L. // Вестн. Ленингр. ун-та. 1981. № 3. С. 38–43.
6. Gould K. S. Leaf heteroblasty in *Pseudopanax crassifolius*: functional significance of leaf morphology and anatomy // Ann. Bot. 1993. Vol. 71. P. 61–70.
7. Day J. S. Light conditions and the evolution of heteroblasty (and the divericcate form) in New Zealand // New Zealand J. Ecology. 1998. Vol. 22, N 1. P. 43–54.
8. Harshi K. G., Linley K. J. Leaf heteroblasty is not an adaptation to shade: seedling anatomical and physiological responses to light // New Zealand J. Ecology. 2007. Vol. 31, N 2. P. 245–254.
9. Романова Н. Г. Метамерная и индивидуальная изменчивость структурных признаков побега *Sorbus sibirica* Held. // Мат. конф. молодых ученых, посвященной 90-летию со дня рождения академика С. С. Шварца. Екатеринбург, 2009. С. 188–193.
10. Паутов А. А. Рост листьев у видов рода *Populus* (Salicaceae) // Бот. журн. 1995. № 6. С. 18–27.
11. Sylvester A. W., Parker-Clark V., Murray G. A. Leaf shape and anatomy as indicators of phase change in the grasses: comparison of maize, rice, and bluegrass // American J. Botany. 2001. Vol. 88. P. 2157–2167.
12. Regulation of leaf initiation by the terminal EAR1 gene of maize / Veit B., Briggs S. P., Schmidt R. J., Yanofsky M. F., Hake S. // Nature. 1998. Vol. 393. P. 166–168.
13. Kwiatkowska D. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments // American J. Botany. 2004. Vol. 91. P. 1277–1293.
14. Кондратьева-Мельвилъ Е. А., Водолазский Л. Е. Морфологическое и анатомическое строение *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) в онтогенезе // Бот. журн. 1982. № 8. С. 1060–1067.
15. Зеленев А. Н. Потенциал гетерофильной формы гороха и пути его реализации // Аграрная Россия. 2011. № 3. С. 13–16.
16. Васильев Б. П., Звонцова Н. А. Развитие листа *Nicotiana rustica* L. при дефиците азота // Вопросы экологической анатомии и физиологии растений. Л., 1978. С. 22–37.
17. Паутов А. А. Изменчивость строения листа у представителей рода *Populus* (Salicaceae) // Бот. журн. 1994. № 7. С. 27–36.
18. Василевская В. К., Антонова И. С. К вопросу о пластичности строения листа // Вопросы экологической анатомии и физиологии растений. Л., 1978. С. 5–22.
19. Недуха О. М. Гетерофілія у рослин. Київ, 2011. 192 с.
20. ASYMMETRIC LEAVES1, an *Arabidopsis* gene that is involved in the control of cell differentiation in leaves / Sun Y., Zhou Q., Zhang W., Fu Y., Huang H. // Planta. 2002. Vol. 214. P. 694–702.
21. Eckardt N. A. The role of PHANTASTICA in leaf development // Plant Cell. 2004. Vol. 16. P. 1073–1075.
22. Gunawardena A. H. L. A. N., Greenwood J. S., Dengler N. G. Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development // Plant Cell. 2004. Vol. 16. P. 60–73.
23. Kawai-Yamada M., Otori Y., Uchimiya H. Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death // Plant Cell. 2004. Vol. 16. P. 21–32.
24. Левицкий С. Н. Генетический полиморфизм в популяциях *Trifolium repens*, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки территорий // Фундаментальные исследования. 2013. № 4. С. 108–111.
25. Тіханков І. О. Представники роду *Lolium* у фізіологічних дослідженнях // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2008а. Вип. 48. С. 174–188.
26. Ракитин Ю. В., Рудник В. Е. Первичная биологическая оценка химических соединений в качестве регуляторов роста растений и гербицидов // Ю. В. Ракитин. Избранные труды. Химические регуляторы жизнедеятельности растений. М., 1983. С. 232–246.
27. Гайер Г. Электронная гистохимия. М., 1974. 488 с.
28. Тіханков І. О. Поліхромне фарбування напівтонких епонових і епон-аралдитових зрізів // Мат. Всеукр. наук.-практ. конф. «Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин». Дніпропетровськ, 2007. С. 131–132.
29. Тіханков І. О. Різномірність анатомічної структури *Lolium perenne* L. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2008б. Вип. 48. С. 59–68.
30. Тіханков І. О. Показники росту, як критерії оцінки гетеробластії дерноутворюючих трав // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологія. 2008в. Вип. 24. С. 227–233.

31. *Бронштейн И. Н., Семендяев К. А.* Справочник по математике для инженеров и учащихся втузов. М., 1953. 610 с.

32. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. М., 1990. 352 с.

33. *Tikhankov I.* Heteroblasty of the *Lolium perenne* L. // *Visnyk Lviv university. Biology series.* 2009. Iss. 49. P.53–62.

34. *Гамалей Ю. В.* Флоэма листа: развитие структуры и функций в связи с эволюцией цветковых растений. Л., 1990. 144 с.

Статья поступила в редакцию 17 января 2014 г.

Сведения об авторе

Тиханков Игорь Александрович — ассистент

Tikhankov Igor A. — Assistant