

## БОТАНИКА

УДК 582.473:581.148.5:581.132:581.824.2

А. И. Арбичева, А. А. Паутов, О. В. Войцеховская

### ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА И ЭКСПОРТА АССИМИЛЯТОВ У МНОГОЛЕТНИХ ЛИСТЬЕВ *AGATHIS BROWNII* LEM. (ARAUCARIACEAE)

Лист растения в процессе своего развития переходит от гетеротрофного состояния к автотрофному, импортируя ассимиляты в начале роста и экспортируя их по мере того, как возрастающая фотосинтетическая активность листа начинает превышать его собственные потребности [1, 2]. Продолжительность жизни листьев у большого числа растений составляет 10 и более лет, при этом для ряда таких видов характерно образование в жилках листа вторичной флоэмы [3–7]. С возрастом в стареющем листе сокращается содержание РУБИСКО [8–10], падает электронтранспортная активность [8], сопряженно снижаются концентрации белка и фотосинтетических пигментов [8, 11–13]. Эти процессы сопровождаются падением интенсивности фотосинтеза. У растений с однолетними листьями стареющий лист в определенный момент также теряет свою донорную функцию. Однако взаимосвязь между старением листа и потерей его донорной роли в углеродном балансе вечнозеленых растений не столь очевидна и изучена в меньшей степени. В связи с этим возникает вопрос, играют ли многолетние листья вечнозеленых двудольных и голосеменных заметную роль в продукционном процессе растения, и какие структурно-функциональные признаки ее характеризуют.

Целью данной работы являлось сравнение способности разновозрастных листьев *Agathis brownii* выступать в качестве доноров фотоассимилятов. В задачи работы входило изучение числа и состояния их проводящих элементов, а также определение содержания фотосинтетических пигментов, скорости видимого фотосинтеза, оценка интенсивности флоэмной загрузки ассимилятов в разновозрастных листьях.

Агатис Брауна — представитель тропических голосеменных, листья которого живут более 10 лет, по некоторым данным до 20 [14], чем и объясняется выбор этого вида в качестве объекта исследования. Строение его листа было описано ранее [15].

#### Материалы и методы исследования

Листья *Agathis brownii* Lem. (*Araucariaceae*) собирали в оранжерее Ботанического сада Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН с 56-летнего дерева. При проведении физиологических исследований использовали листья возрастом 1 год и 7 лет, гистологических — 1–12 лет.

Исследовали поперечные срезы черешков. Материал для световой и трансмиссионной электронной микроскопии фиксировали в 3%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) с постфиксацией в 2%-ном растворе OsO<sub>4</sub> в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0). После обезвоживания в серии спиртов и ацетонов возрастающих концентраций материал заключали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие срезы толщиной 1–3 мкм были изготовлены на ультратоме Sorvall RMC MT5000 (Du Pont Company, США). Их контрастировали раствором цитрата свинца, приготовленного по методике автора работы [16]. Микрофотографии были получены на электронном микроскопе Tesla BS-500 (Югославия). Просмотр и фотографирование полутонких срезов проводили с помощью микроскопа Olympus BX51 (Olympus Optical Co., Япония).

Для определения содержания в листьях хлорофиллов и суммарного количества каротиноидов готовили вытяжки в 100%-ном ацетоне из участков листьев площадью 1 см<sup>2</sup>. Концентрацию пигментов определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Измерения проводились в трех повторностях. Расчет концентраций пигментов производился по формулам авторов из работы [17], после чего вычислялось их содержание в единице площади листовой поверхности.

Для определения интенсивности поглощения жилками <sup>14</sup>C-сахарозы из апопласта [18] листья срезали с побегов острой бритвой, повторно подрезали под водой и помещали черешками в растворы, содержащие радиоактивную метку. В качестве метки использовали <sup>14</sup>C-сахарозу концентрацией 0,01 мМ и удельной радиоактивностью 1010 Бк/ммоль в MES-буфере (20 мМ, рН 6,0). Данный раствор использовали либо без добавок, либо (в качестве негативного контроля) к нему добавляли <sup>12</sup>C-сахарозу до конечной концентрации 20 мМ. После 30 мин экспозиции листья переносили в дистиллированную воду на 30 мин. Затем из средней части пластинки вырезали кусочки  $d = 0,5$  см, содержащие жилки, их быстро высушивали на нагревательном столике при 80 °С и помещали на фотографическую пленку Kodak MIN RS Wlms на 8 дней.

Величины интенсивности фотосинтеза и транспирации листьев измеряли в освещенных участках кроны на неотделенных листьях с 9:00 до 11:00 ч в оранжерее Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН. Измерения проводились в трехкратной повторности для листьев возрастом 1 год и 7 лет портативным газоанализатором марки LCA-4 (ADC, Великобритания). Для построения световых кривых снижение уровня освещенности в камере газоанализатора производили с помощью последовательно растущего числа сложенных марли.

### Результаты исследований

Листья *A. brownii* последнего года прироста располагаются на периферии, в условиях лучшего освещения. Среднее содержание хлорофилла *a* в них составляет  $0,028 \pm 0,011$  мг/см<sup>2</sup> листа, хлорофилла *b* —  $0,009 \pm 0,001$  мг/см<sup>2</sup>, суммарное содержание каротиноидов —  $0,006 \pm 0,001$  мг/см<sup>2</sup> (рис. 1). Соотношение хлорофилла *a* к *b* — 3,11. Световой компенсационный пункт, т.е. точка, в которой количество поглощенной при фотосинтезе углекислоты равно количеству, выделенному при дыхании, у листьев первого года имеет место при плотности потока фотонов фотосинтетически активной радиации (ФАР) около 100 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>с). Световое насыщение

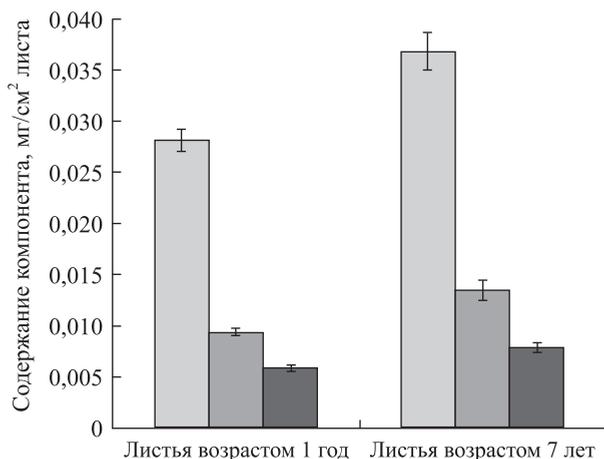


Рис. 1. Содержание фотосинтетических пигментов в разно-возрастных листьях

Темной заливкой показан хлорофилл *b*; светлой — хлорофилл *a*; белым цветом — каротиноиды.

видимого фотосинтеза начинается при освещенности около 600 мкмоль фотонов / (м<sup>2</sup>с) (рис. 2).

Листья возрастом 7 лет удалены вглубь кроны и получают меньшее количество солнечной радиации. Содержание хлорофилла *a* составляет в них  $0,037 \pm 0,002$  мг/см<sup>2</sup> листа, хлорофилла *b* —  $0,013 \pm 0,001$  мг/см<sup>2</sup>, суммарное содержание каротиноидов —  $0,008 \pm 0,001$  мг/см<sup>2</sup> (см. рис. 1). Соотношение хлорофилла *a* к *b* равно 2,85. Световой компенсационный пункт этих листьев имеет место при плотности потока ФАР 50 мкмоль фотонов / (м<sup>2</sup>с), а световое насыщение процесса связывания углерода происходит при освещенности около 270 мкмоль фотонов / (м<sup>2</sup>с) (см. рис. 2).

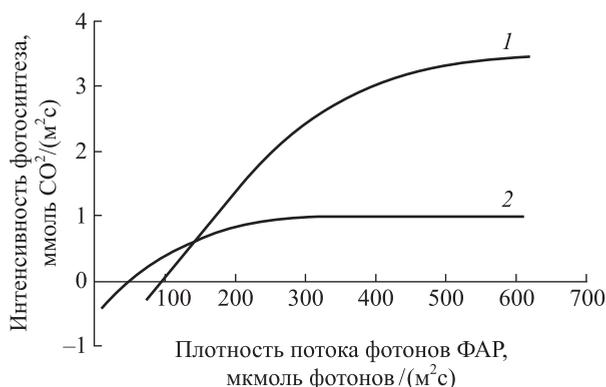


Рис. 2. Интенсивность фотосинтеза разновозрастных листьев:

1 — интенсивность поглощения CO<sub>2</sub> для листьев возрастом 1 год; 2 — интенсивность поглощения CO<sub>2</sub> для листьев возрастом 7 лет.

На рис. 3 показана интенсивность поглощения меченой сахарозы из апопласта жилками листьев обоих исследованных возрастов. В экспериментах за введением метки в апопласт листьев через черешок следовало помещение листьев на воду, когда дистиллированная вода в течение 30 мин замещала в ксилеме раствор с сахарозой. После этого периода на автордиограммах можно было видеть картину распределения метки в тканях листа за общее время опыта (1 ч). На рис. 3, 1 видно, что жилки однолетних листьев метились ярко, а экспозиция в том же растворе, но содержащем, кроме меченой сахарозы, избыток немеченой, не приводила к мечению жилок (рис. 3, 2). В то же время у листьев 7-летнего возраста (рис. 3, 3, 4) мечение жилок выражено одинаково слабо как при отсутствии, так и при наличии избытка немеченой сахарозы, и практически сходно с мечением жилок в опыте, показанном на рис. 3, 2 у молодых листьев.

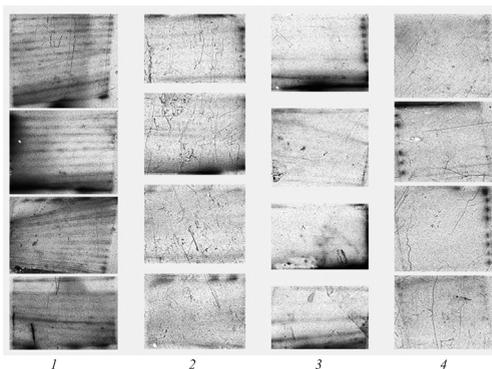


Рис. 3. Загрузка  $^{14}\text{C}$ -сахарозы во флоэму разновозрастных листьев *A. brownii*:

1 — листья возрастом 1 год,  $^{14}\text{C}$ -сахароза; 2 — листья возрастом 1 год,  $^{14}\text{C}$ - и  $^{12}\text{C}$ -сахароза (контроль); 3 — листья возрастом 7 лет,  $^{14}\text{C}$ -сахароза; 4 — листья возрастом 7 лет,  $^{14}\text{C}$ - и  $^{12}\text{C}$ -сахароза (контроль).

### Обсуждение результатов исследования

Старые листья *A. brownii* находятся в условиях худшей освещенности по сравнению с листьями последнего года прироста. Максимальные величины потока ФАР, зарегистрированные в оранжерее до проведения эксперимента, составляли для старых листьев  $\sim 80$  фотонов/( $\text{м}^2\text{с}$ ), а для молодых —  $800$  фотонов/( $\text{м}^2\text{с}$ ). Проведенные исследования фотосинтетической активности старых листьев позволяют охарактеризовать их с физиологической точки зрения как более теневые. Об этом свидетельствуют соотношение хлорофиллов *a* и *b*, а также тот факт, что их световая кривая значительно раньше выходит на плато, а компенсационный пункт фиксации углекислоты находится при низких значениях освещенности. При этом для них характерно повышенное содержание фотосинтетических пигментов, что является компенсаторным механизмом и нередко наблюдается для листьев сциофитов [19].

Известно, что основной транспортной формой ассимилированного в процессе фотосинтеза углерода у высших растений является сахароза. Загрузка сахарозы во флоэму из апопласта листа происходит активно против градиента концентрации с помощью белков-симпортеров сахарозы и протона, расположенных на плазмалемме флоэмных элементов. Поэтому для сравнительной оценки скорости поглощения сахарозы жилками в процессе загрузки флоэмы листа ассимилятами использовали меченую сахарозу. При помещении черешков листьев на раствор меченой сахарозы метка с ксилемным потоком поднималась по ксилеме и попадала в апопласт листа. Оттуда метка могла поступать в ситовидные клетки, либо поглощаться другими тканями листа. На распределение метки влияют скорости поглощения ее тканями, которые

зависят от свойств транспортных систем плазмалеммы клеток этих тканей. Поскольку константы связывания субстрата у сахарозного симпортера для меченой и немеченой сахарозы сходны [20], то при избытке немеченой сахарозы в апопласте преимущественно загружается в жилки именно она, и метка не аккумулируется в жилках. Таким образом, «исчезновение» мечения жилок при добавлении в раствор с меткой немеченой сахарозы является индикатором того, что мечение жилок происходит именно в результате работы сахарозного переносчика в ходе загрузки флоэмы. В проведенных экспериментах отмечалось интенсивное мечение жилок листьев первого года, в то время как жилки листьев семилетнего возраста оставались практически немечеными. Это свидетельствует о том, что интенсивность процессов загрузки сахарозы в жилки у старых листьев крайне низка.

Гистологические исследования показали, что по мере старения листьев агатиса объем функционирующей в них флоэмы постепенно сокращается. Так, число ситовидных клеток в проводящих пучках черешков уменьшается с 6–8 у 1–2-летних листьев до 2–4 у 11–12-летних листьев (рис. 4, 4, 5, 6). Уменьшение происходит в результате деформации и последующего смятия наиболее старых клеток, расположенных во внешних частях пучков. Со временем смятые ситовидные клетки полностью утрачивают свои полости (рис. 4, 3). Падение интенсивности загрузки флоэмы у листьев возрастом 7 лет может объясняться как данным процессом, так и нарушениями в работе непосред-

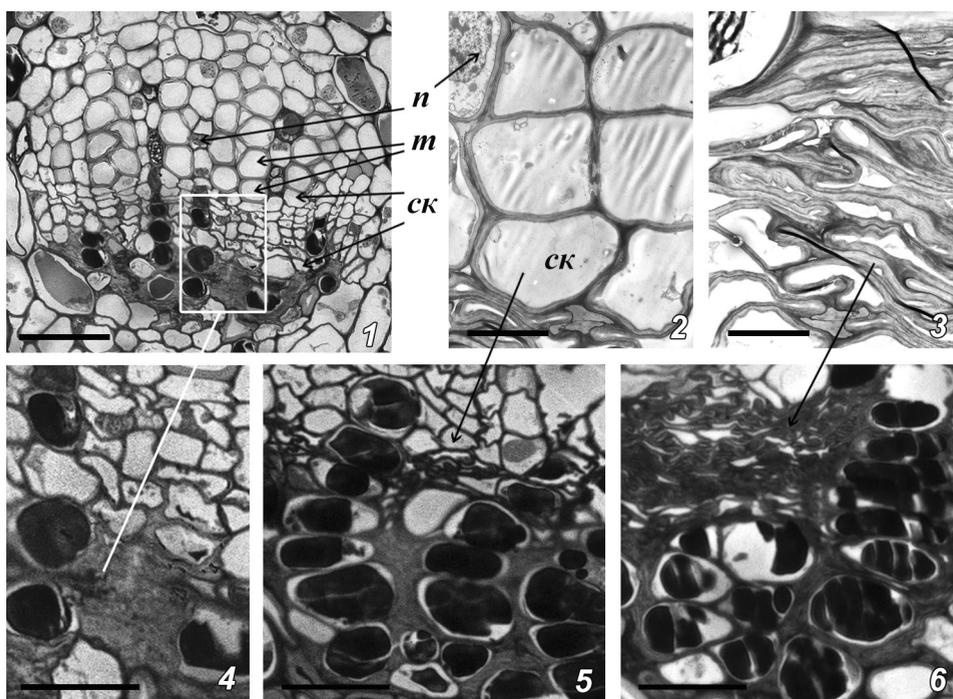


Рис. 4. Строение проводящих тканей черешков разновозрастных листьев:

1 — проводящий пучок черешка листа возрастом 1 год; 2 — недеформированная и 3 — смятая флоэмы листа возрастом 7 лет; 4, 5, 6 — фрагменты проводящих пучков черешков листьев возрастом 1, 7 и 12 лет соответственно. *t* — трахеида; *ск* — ситовидная клетка; *n* — клетка паренхимы. Масштабная линейка: 1 — 20 мкм; 2, 3 — 0,5 мкм; 4, 5, 6 — 10 мкм.

ственно сахарозного переносчика, связанными с процессами старения клеток флоэмы. По мере старения роль листьев *A. brownii* в транспорте продуктов ассимиляции, по-видимому, ослабевает.

\* \* \*

Авторы выражают глубокую благодарность Е. В. Тютеревой (Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН) за ценные методические замечания и критические комментарии.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения № 8716 и № 8133.

## Литература

1. Isebrands J. G., Larson P. R. Anatomical changes during leaf ontogeny in *Populus deltoides* // Amer. J. Bot. 1973. Vol. 60. P. 199–208.
2. Turgeon R., Webb J. A. Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo*: transition from import to export // Planta. 1973. Vol. 113, N 2. P. 179–191.
3. Elliott J. H. The development of the vascular system in evergreen leaves more than one year old // Ann. Bot. 1937. Vol. 1. P. 107–127.
4. Ewers F. W. Developmental and cytological evidence for mode of origin of secondary phloem in needle leaves of *Pinus longaeva* (Bristlecone pine) and *P. flexilis* // Bot. Jb. 1982a. B. 103, H. 1. S. 59–88.
5. Ewers F. W., Aloni R. Seasonal secondary growth in needle leaves of *Pinus strobus* and *Pinus brutia* // Amer. J. Bot. 1987. Vol. 74, N 7. P. 980–987.
6. Ewers F. W. Secondary growth in needle leaves of *Pinus longaeva* (Bristlecone pine) and other conifers: quantitative data // Amer. J. Bot. 1982b. Vol. 69, N 10. P. 1552–1559.
7. Ewers F. W., Schmid R. The long-term changes in the anatomy of needles of *Pinus longaeva* (Bristlecone pine: abstr.) // Miscellaneous series. Botanical Society of America Publ., 1978. Vol. 156. P. 74.
8. Ford D. M., Shibles R. Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean leaf senescence // Plant Physiol. 1988. Vol. 86, N 1. P. 108–111.
9. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves / Wada S., Ishida H., Izumi M., Yoshimoto K., Ohsumi Y., Mae T., Makino A. // Plant Physiol. 2009. Vol. 149. P. 885–893.
10. Wardley T. M., Bhalha P. L., Dalling M. J. Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached primary leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Physiol. 1984. Vol. 75, N 2. P. 421–424.
11. Cran D. G., Possingham J. V. The effect of cell age on chloroplast structure and chlorophyll in cultured spinach leaf discs // Protoplasma. 1974. Vol. 79, N 1. P. 197–213.
12. Lewington R. J., Talbot M., Simon E. W. The yellowing of attached and detached cucumber cotyledons // J. Exper. Bot. 1967. Vol. 18, N 56. P. 526–534.
13. Гамалей Ю. В., Куликов Г. В. Возрастные изменения клеток мезофилла листопадных и вечнозеленых растений. Л.: Наука, 1977. 192 с.
14. Муравьева О. А., Борхвардт В. С., Жилин С. Г. Жизнь растений. М.: Просвещение, 1980. Т. 5. 496 с.
15. Паутов А. А., Арбичева А. И., Яковлева О. В. Корреляции признаков строения листа *Agathis brownii* Lem. // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3: Биология. 2010. Вып. 3. С. 21–28.
16. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. Vol. 17. P. 208–212.

17. Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // Biochemical Society Transactions. 1983. Vol. 11. P. 591–592.

18. Two novel disaccharides, rutinose and methylrutinose, are involved in carbon metabolism in *Datisca glomerata* / Schubert M., Melnikova A. N., Mesecke N., Zubkova E. K., Fortte R., Batashev D. R., Barth I., Sauer N., Gamalei Yu. V., Mamushina N. S., Tietze L. F., Voitsekhovskaja O. V., Pawlowski K. // Planta. 2010. Vol. 231. P. 507–521.

19. Горышина Т. К. Экология растений: учеб. пособие. М.: Высш. школа, 1979. 368 с.

20. Wilson C., Lucas W. J. Influence of internal sugar levels on apoplasmic retrieval of exogenous sucrose in source leaf tissue // Plant Physiol. 1987. Vol. 84. P. 1088–1095.

Статья поступила в редакцию 7 июня 2012 г.