

ФЛОРА, ФАУНА

УДК 581.815

АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ ЛИСТЬЕВ *LOLIUM PERENNE L.*, СФОРМИРОВАВШИХСЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРАЗИДА МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

И.А. Тиханков

(кафедра физиологии и интродукции растений

Днепропетровского национального университета им. О. Гончара; e-mail: 24traven@ukr.net)

Показано, что при обработке семян райграса гидразидом малеиновой кислоты глубина и диапазон реакции основных структурных элементов возрастают с увеличением порядкового номера листа и определяются стадией его развития на момент аппликации препарата. Установлено, что изменение продолжительности обработки более эффективно, чем увеличение концентрации препарата, и может приводить как к угнетению, так и к усилению развития листа и его проводящей системы. Обсуждается связь между анатомическими изменениями структуры листа под действием ГМК и работой генома.

Ключевые слова: проводящая система, флоэма, ксилема, морфогенез, гидразид малеиновой кислоты, райграс.

Изучение закономерностей формирования тканей и органов растительных организмов является одной из наиболее актуальных задач физиологии растений. Такие исследования открывают возможность управления процессом морфогенеза, что позволяет получать организмы с желаемыми свойствами. Реализовать этот подход можно, обрабатывая растения физиологически активными веществами в определенные моменты их развития [1, 2]. Глубина таких преобразований зависит от способа воздействия на регуляторные системы, его избирательности и силы, а также от состояния самого растения на момент обработки.

Одним из инструментов такого воздействия могут быть вещества, оказывающие влияние на генетическую систему регуляции. Поскольку сам по себе морфогенез является следствием последовательного переключения генов [3], то результат обработки будет во многом определяться временем и продолжительностью аппликации препарата.

Особый интерес представляют проводящие пучки, так как их развитие контролируется разными группами генов, которые последовательно включаются в этот процесс, начиная с момента закладки примордия и заканчивая формированием структуры мезофилла, присущего развитым листовым пластинкам [3]. Следует также учитывать, что в обкладках проводящих пучков синтезируется микроРНК, которая принимает непосредственное участие в морфогенезе и роль которой в этом процессе остается еще недостаточно изученной [4]. Кроме того, путем изменения строения транспортной системы можно косвенно влиять на развитие и функционирование других структурных элементов растений.

Целью настоящей работы было изучение возможностей регуляции формирования проводящих пучков в листьях *Lolium perenne L.* путем предварительной обработки семян слабым мутагеном — гидразидом малеиновой кислоты (ГМК).

Объекты и методы

Объектом исследования стала проводящая система трех первых листьев райграса (*L. perenne*), начинающих свое формирование в разные периоды онтогенеза [5]. В качестве инструмента воздействия на генную систему регуляции был выбран гидразид малеиновой кислоты — препарат, обладающий слабыми мутагенными и кластогенными свойствами [6]. Выбор *L. perenne* обусловлен тем, что это растение имеет определенные преимущества по сравнению с традиционно используемыми в исследованиях арабидопсимом, рисом, кукурузой и др. [7].

Опыты проводились на сортах Rapid и Saini, отличающихся друг от друга по реакции на ГМК [8]. Растворы препарата готовились в концентрации 0,0005 и 0,008%. Обработка семян проводилась в течение 24 и 48 ч. Для контроля семена выдерживались в дистилляте. Условия обработки, выращивания растений и методика подготовки препаратов к микроскопии описаны ранее [8]. Постоянные препараты изучались на микроскопе “Биолам” с микрофотонасадкой МФН-12. После оцифровки изображения проводилась морфометрия с использованием программы ImageJ. Определялась площадь центрального и латерального проводящих пучков, их внешних обкладок, а также проводящих элементов

ксилемы и флоэмы. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась в программе Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

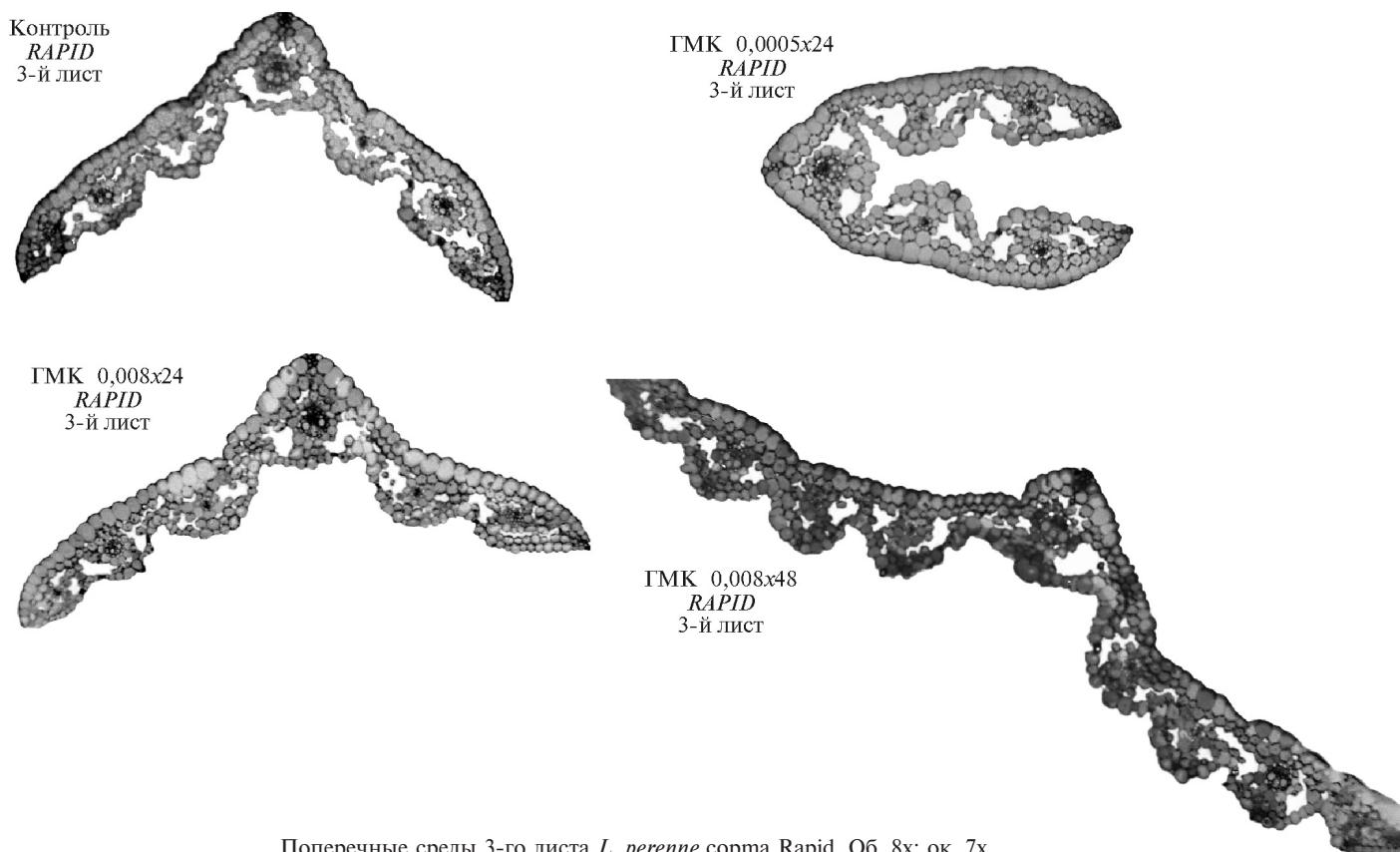
В листьях *L. perenne* обычно находится пять продольных проводящих пучков, отличающихся между собой размерами и степенью развития структурных элементов. Наиболее развит центральный пучок. Он формируется раньше других [5] и достигает наиболее высокого уровня дифференциации. Латеральный пучок значительно меньшего диаметра, а на его поперечных срезах иногда тяжело идентифицировать отдельные типы клеток. Расположенный между ними 2-й пучок чрезвычайно слабо дифференцирован. Кроме того, в зерновках *L. perenne* находятся два листа, начавших свое формирование в эмбриональном периоде, а третий представлен только слабо развитым примордием [5]. Все это дает возможность предположить, что варьирование продолжительности обработки препаратом приведет к тому, что под воздействием ГМК окажутся разные группы генов, обеспечивающих формирование проводящей системы в отдельных листьях и их частях.

Первым свидетельством правильности такого подхода стал факт изменения количества проводящих пучков в зависимости от концентрации раствора ГМК и продолжительности его аппликации (табл. 1).

Таблица 1
Количество проводящих пучков в листьях *L. perenne*

Сорт	Лист	Вариант обработки			
		контроль	ГМК 0,0005 × 24	ГМК 0,008 × 24	ГМК 0,008 × 48
Rapid	1-й	5	5	5	5
	2-й	5–6	5–6	5–6	6
	3-й	5–6	5–6	6	9
Sakini	1-й	3–4	3–4	3–4	3–4
	2-й	5	5	5	6
	3-й	5	6	6	6

Эти данные показывают, что 1-й лист оказался нечувствительным к действию препарата, а наиболее значительные изменения произошли в 3-м листе, который на момент обработки еще не начал формироваться. Промежуточное положение занимает 2-й лист, у которого количество проводящих пучков увеличивалось только в случае интенсивной обработки семян, предполагающей сочетание высокой концентрации препарата и длительной 48-часовой обработки. В 3-м листе наблюдалось возрастание количества пучков уже при использовании низкой концентрации ГМК в течение 24 ч (сорт Sakini). Все эти изменения сводились к стабильному формированию чрезвычайно слабо дифференцированного пучка малого диаметра в крайней дистальной зоне листовой пластинки, сразу за латеральным пучком. Наиболее поразитель-



ный результат был получен для 3-го листа сорта *Rapid*: при интенсивной обработке количество пучков возросло до девяти (рисунок). Все они были малого диаметра и слабо дифференцированы.

Таким образом, препарат наиболее эффективен тогда, когда его аппликация совпадает с начальными этапами формирования/развития примордия 3-го листа. Хорошо известно, что место закладки проводящих пучков у однодольных определяется именно в этот момент работой генов *PNH* [3], которые несколько позднее переходят в состояние молчания, а вместо них подключаются гены группы *TERMINAL EAR 1, KNOX* и др. [3, 9], определяющие характер развития отдельных структурных элементов, но не саму возможность появления пучка. Поэтому можно предположить, что в 1-м листе *L. perenne* на момент обработки экспрессия генов типа *PNH* уже завершилась. Отсутствует она и во 2-м листе, но возможно, что при определенных условиях некото-

рые из этих генов могут оказаться под воздействием ГМК. В 3-м листе эти гены находятся в активном состоянии, благодаря чему доступны молекулам ГМК. Что касается межсортовых отличий по 3-му листу, то их можно объяснить, исходя из временных различий в закладке проводящих пучков у *Rapid* и *Sakini* и генетически обусловленной чувствительности к препарату.

Для анализа реакции отдельных тканей на действие ГМК удобно пользоваться не абсолютными величинами площади структурных элементов на поперечных срезах, а относительными. Для этого вводится коэффициент физиологической активности препарата (КФА), который определяется делением площади конкретной структуры в опытном варианте к ее площади в контроле [10].

Полученные результаты (табл. 2) демонстрируют зависимость реакции проводящей системы от способа обработки семян, стадии развития проводящих

Таблица 2

Коэффициент физиологической активности ГМК по отношению к проводящим пучкам *L. perenne*

Лист	Сорт	Параметр	Вариант обработки					
			ГМК 0,0005 × 24		ГМК 0,008 × 24		ГМК 0,008 × 48	
			центр. пучок	латер. пучок	центр. пучок	латер. пучок	центр. пучок	латер. пучок
1-й	Rapid	Весь пучок	0,85	0,89	0,85	1,12	0,87	0,86
		Обкладка пучка	0,88	0,66	0,91	0,75	0,98	0,88
		Ксилема	0,95	0,94	0,81	1,64	1,03	0,95
		Флоэма	0,85	0,61	0,70	0,52	1,02	0,54
	Sakini	Весь пучок	0,94	0,82	0,77	0,78	0,85	0,63
		Обкладка пучка	0,75	0,75	0,73	0,75	0,86	0,72
		Ксилема	0,81	0,58	0,70	0,50	0,51	0,29
		Флоэма	0,78	0,73	0,59	0,57	0,45	0,57
2-й	Rapid	Весь пучок	1,15	0,74	1,08	0,85	1,00	1,06
		Обкладка пучка	0,93	1,11	0,92	1,41	0,85	1,66
		Ксилема	0,96	—	0,82	—	0,90	—
		Флоэма	1,28	0,81	1,42	0,87	1,09	0,72
	Sakini	Весь пучок	0,67	1,16	0,99	1,24	0,85	0,97
		Обкладка пучка	0,60	0,99	0,92	0,93	0,81	0,79
		Ксилема	0,69	—	0,94	—	0,79	—
		Флоэма	0,60	0,75	0,82	1,05	0,78	1,01
3-й	Rapid	Весь пучок	0,97	0,76	1,02	0,69	1,35	—
		Обкладка пучка	1,07	1,28	1,20	1,09	1,12	—
		Ксилема	0,64	—	0,85	—	1,39	—
		Флоэма	0,83	0,82	0,83	0,57	1,50	—
	Sakini	Весь пучок	1,02	0,92	1,03	0,96	0,88	0,89
		Обкладка пучка	0,79	1,02	0,94	1,29	0,63	0,85
		Ксилема	0,96	0,88	1,00	0,88	0,70	0,71
		Флоэма	0,83	0,71	1,13	1,24	0,95	0,99

пучков и листьев на момент аппликации препарата, а также сортовых особенностей растений.

В первую очередь необходимо отметить, что иногда структурный элемент может реагировать только на само присутствие ГМК, но не на изменение его концентрации или продолжительность обработки. Это касается, например, центрального пучка 1-го листа Rapid, площадь которого уменьшилась приблизительно на 15%. Подобную ригидность проявляет в этом листе того же сорта менее дифференцированный латеральный пучок. Однако при определенной концентрации ГМК (0,008%) и непродолжительной обработке наблюдалось увеличение его размеров по сравнению с контролем на 12%. Длительная обработка такой эффект нивелировала. Вероятно, для достижения положительного результата необходима точная подборка концентрации и узкий временной интервал обработки, что, вероятно, связано с последовательной работой генов в онтогенезе. Для сорта Sakini характерна большая лабильность проводящих пучков 1-го листа, особенно менее дифференцированного латерального. Однако с повышением порядкового номера листа наблюдалось отсутствие реакции либо на изменение концентрации ГМК (флоэма центрального пучка 3-го листа Rapid), либо на продолжительность обработки (флоэма латерального пучка 2-го листа Sakini). Как правило, изменение продолжительности аппликации было более эффективным, чем изменение концентрации, что максимально проявилось в 3-м листе обоих сортов, который в момент обработки, в отличие от первых двух листьев, был представлен примордием. Учитывая полученные ранее результаты [8], сводить увеличение продолжительности обработки к простому повышению содержания препарата в тканях нельзя.

Концентрация 0,008% является пороговой, ее превышение ведет к резкому угнетению развития независимо от длительности аппликации ГМК и сортовых особенностей растений [8]. Следствием длительной (48-часовой) обработки этим раствором был слабый ретардантный эффект (Sakini), усиливающийся с повышением порядкового номера листа, но также наблюдалась значительная стимуляция развития (3-й лист Rapid). Важным моментом является то, что с возрастанием порядкового номера листа увеличивается разнообразие и диапазон реакции на ГМК. То есть препарат наиболее эффективен при его применении на ранних этапах развития органов.

Что касается проводящих элементов ксилемы и флоэмы, то их реакция часто не является идентич-

ной. В зависимости от способа обработки более сильное влияние испытывала или ксилема, или флоэма. Если сравнивать реакцию этих тканей на ГМК в отдельных листьях, то в 1-м и 3-м их площадь на поперечных срезах как в центральном, так и в латеральном пучке изменялась одинаково — уменьшалась или возрастила. Но для 2-го листа было характерно усиление развития, например, флоэмы в одном пучке и его угнетение в другом. Это может свидетельствовать о том, что гены, отвечающие за формирование флоэмы, наиболее уязвимы по отношению к ГМК в том узком временном интервале, в котором находился 2-й лист на момент обработки.

Следует отметить, что при значительном уменьшении площади этих двух тканей площадь самого пучка может измениться в значительно меньшей степени (центральный пучок 3-го листа обоих сортов). Это указывает на особую роль паренхимных элементов и внутренней обкладки в стабилизации размеров пучка. Такой результат может свидетельствовать о защитной реакции растения на действие чужеродного фактора, что проявляется на анатомическом уровне. Этот эффект отсутствует в 3-м листе при длительной обработке семян. Очевидно, что 48-часовая обработка дестабилизирует системы регуляции морфогенеза тем сильнее, чем больше порядковый номер листа. У сорта Sakini такая дестабилизация проявилась в сильном угнетении развития, а у сорта Rapid — в чрезвычайно интенсивном развитии 3-го листа [8] и его структурных элементов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение ГМК на ранних стадиях формирования органов и тканей приводит к более значительным перестройкам их структуры, чем на более поздних этапах, что проявляется в увеличении количества проводящих пучков, увеличении глубины и ширины диапазона реакции тканей, с возрастанием порядкового номера листа. Для достижения максимального эффекта необходима точная подборка интервала обработки препаратом. Так, наиболее значительные изменения количества проводящих пучков произошли в 3-м листе, а наибольшее разнообразие реакции проводящих элементов наблюдалось во 2-м. Определенные структуры могут проявлять индифферентность по отношению к изменению концентрации ГМК и/или продолжительности обработки. Но наиболее глубокие изменения произошли в 3-м листе при 48-часовой аппликации ГМК. При этом для сорта Rapid наблюдалось усиление развития, а для Sakini — его угнетение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beggs A. Special report: Plant growth regulators: What does the future hold? // Int. Turfgrass Bull. 2002. Vol. 216. P. 5—6.
2. Shibaoka H. Promotion of adventitious root formation by heliangine and its removal by cysteine // Plant Cell Physiol. 1967. Vol. 8. P. 161—170.
3. Kwiatkowska D. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments // Am. J. Bot. 2004. Vol. 91. P. 1277—1293.
4. Eckardt N. A CLASSY RNA silencing signaling mutant in *arabidopsis* // Plant Cell. 2007. Vol. 19. P. 1439.

5. Тіханков I.O. Різнорідність анатомічної структури листкової пластиинки *Lolium perenne* L. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2008. Вип. 48. С. 59–68.
6. Gichner T., Menke M., Stavreva D. et al. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans // Mutagenesis. 2000. Vol. 15. N 5. P. 385–389.
7. Тіханков I.O. Представники роду *Lolium* у фізіологічних дослідженнях // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2008. Вип. 48. С. 174–188.
8. Тіханков I.O. Морфо-фізіологічна характеристика листків *Lolium perenne* L. після попередньої обробки насіння гідразидом малеїнової кислоти // Питання біоіндикації та екології. 2008. Вип. 13. № 1. С. 33–45.
9. Veit B., Briggs S., Schmidt R. et al. Regulation of Leaf Initiation by the TERMINAL EAR 1 gene of maize // Nature. 1998. Vol. 393. P. 166–168.
10. Тіханков I.O. Розвиток колеоптиля пажитниці під впливом гідразиду малеїнової кислоти у різних температурних умовах // Вісник Дніпропетровського університету. Серія біологія, екологія. 2006. Вип. 3. С. 175–180.

Поступила в редакцію
26.06.12

ANATOMICAL PECULIARITIES OF VASCULAR SYSTEM OF *LOLIUM PERENNE* L. LEAVES, GROWING UNDER MALEIC HYDRAZIDE INFLUENCE

I.A. Tikhankov

It was founded, that ryegrass seeds treatment by maleic hydrazide leads to deep and different transformation of basic structural components of leaves anatomy. The results of this transformation depend from leave development stage and increase with growing of leave number. The prolongation of treatment is more efficient than increasing of drug concentration and may as suppress the development of leaves and there vascular system so promote one. The connection between leaf anatomy transformation after maleic hydrazide treatment and genome function was discussed.

Key words: *vascular system, phloem, xylem, morphogenesis, maleic hydrazide, ryegrass.*

Сведения об авторе

Тіханков Ігорь Олександрович — асистент кафедри фізиології і інтродукції растений факультета біології, екології і медицини Дніпропетровського національного університета ім. Олеся Гончара. Тел.: +38-056-776-57-29; e-mail: 24traven@ukr.net