

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

На правах рукописи

Лабунская Елена Алексеевна

**Взаимоотношение автотрофной и гетеротрофной ткани
в процессе развития химерного листа *Ficus benjamina* ‘Starlight’**

специальность: 03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена на кафедре физиологии растений Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Чуб Владимир Викторович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Горелова Ольга Андреевна

доктор биологических наук
Ковалева Лидия Валентиновна

Ведущая организация:

Институт фундаментальных проблем биологии РАН (ИФПБ РАН)

Защита диссертации состоится 15 мая 2009 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного Совета Д 501.001.46 при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские Горы, МГУ, Биологический факультет, аудитория М-1.

Факс – (495)939-43-09

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «___» _____ 2009 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета, к.б.н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Пестролистные химерные растения являются удобной моделью для изучения процессов закладки и развития вегетативных органов растений (Satina, 1942; Marcotrigiano, 2000). Для листьев пестролистных химер характерно наличие генотипически разнородных тканей, различающихся по способности к фотосинтезу. В ряде работ отмечена вариабельность участия разных слоев меристематических клеток при образовании примордия листа (Dulieu, 1967; Pohlheim, 1973; Tian, Marcotrigiano, 1994; Тимонин, 1984). Вариабельность ростовых процессов у пестролистных химер можно наблюдать по изменению рисунка листа (Szymkowiak, Sussex, 1996). У периклинальных бело-зеленых химер относительное расположение белой и зеленой зон в меристеме постоянно, но контуры и соотношение площадей этих зон в листьях могут меняться. Однако вопрос о факторах, определяющих соотношение этих зон, до сих пор является открытым, поэтому изучение физиологических механизмов регуляции закладки и дальнейшего коррелятивного развития генетически разнородных фотосинтезирующей и акцепторной зон является актуальным.

На процесс формирования листа влияют как внешние (интенсивность света, концентрация CO_2), так и внутренние (физиологические и генетические) факторы. В частности, под влиянием изменений интенсивности и спектрального состава света, температурных колебаний, засухи, изменения содержания CO_2 в атмосфере и многих других факторов может меняться мезоструктура фотосинтетического аппарата, интенсивность функционирования биохимических циклов, скорость роста и развития, донорно-акцепторные отношения (Мокроносов, 1983; Мокроносов, Гавриленко, 1992). Распределение доноров и акцепторов во времени непостоянно. Все растущие части растительного организма являются акцепторами и, таким образом, донорно-акцепторные отношения играют важную роль в регуляции ростовых процессов и в функционировании фотосинтетического аппарата (Мокроносов, 1983, Turgeon, 2006). Одним из методов характеристики органа как донора или акцептора фотоассимилятов является исследование ультраструктуры тканей листа (Гамалей, 2004). Однако данные по ультраструктуре клеток химерных растений очень малочисленны.

Одной из хороших моделей для изучения регуляции развития листа является пестролистная периклиальная химера *Ficus benjamina* 'Starlight', обладающая постоянным распределением клеточных линий в меристеме, четко отграниченными белой и зеленой зонами в листе, обильно ветвящимися побегами.

Актуальным представляется исследование ультраструктуры клеток мезофилла белой и зеленой зон как в молодом, так и в зрелом листе, а также электронно-микроскопическая характеристика структуры пластид белой зоны. Необходим комплексный подход, позволяющий оценить роль ростовых процессов в регуляции донорно-акцепторных отношений в растении, а также их взаимное влияние.

Цель работы. Установить характер взаимодействия зеленой и белой зон в онтогенезе у пестролистной химеры *Ficus benjamina* L. сорта 'Starlight'. Исследовать влияние донорно-акцепторных отношений на регуляцию закладки листа.

Для ее достижения были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать функционирование фотосинтетического аппарата белой и зеленой зон химеры.
2. Дать электронномикроскопическую характеристику пластид зеленой и белой зон листа пестролистной химеры.
3. Описать структуру меристемы и процесс закладки примордия листа химеры *Ficus benjamina* L. сорта 'Starlight'.
4. Проанализировать анатомические особенности листа пестролистной химеры в связи с взаимодействием генетически разнородных тканей в процессе закладки листа.
5. Проследить динамику ультраструктурных изменений клеток мезофилла белой зоны в ходе онтогенеза листа.
6. Выявить морфофизиологические корреляции между долей фотоассимилирующей поверхности в листе и общей фотосинтезирующей площадью целого растения.

Научная новизна. В работе впервые охарактеризованы анатомо-морфологические, фотосинтетические, ультраструктурные особенности пестролистной химеры *Ficus benjamina* ‘Starlight’. Показано наличие функционально активных хлоропластов в клетках белой зоны. Установлена вероятная причина альбинизма белой зоны. Дано детальное морфолого-анатомическое описание variability развития листа пестролистной химеры. Выявлена зависимость соотношения зеленой и белой зон в листе от положения листа в побеговой системе. Впервые показано влияние суммарной фотоассимилирующей поверхности листьев побега на соотношение генетически разнородных зон в зрелом листе, доказано, что эти процессы происходят на уровне закладки примордия. Охарактеризована возрастная динамика изменений ультраструктуры клеток мезофилла белой и зеленой зон. Доказана функциональная активность хлоропластов в клетках белой зоны у *Ficus benjamina* ‘Starlight’. Описан процесс частичной деградации клеток белой зоны в онтогенезе листа. Дана комплексная характеристика взаимодействия донорного и акцепторного компонента в пределах листа и в системе целого растения пестролистной химеры.

Практическая значимость работы. Представляемая работа вносит существенный вклад в исследования многоуровневой системы регуляции формирования листа на примере пестролистной химеры *Ficus benjamina* ‘Starlight’. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по физиологии и анатомии растений. Эти данные также можно применить в практической деятельности цветоводов при разработке агротехники выращивания декоративно-лиственных растений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XII молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2005), на VI съезде Общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007), на научном семинаре в Институте фундаментальных проблем биологии (ИФПБ РАН) (Пушино-на-Оке, 2008), на XVI конгрессе Федерации

европейских обществ физиологов растений FESPB (Финляндия, 2008), на XII съезде Русского ботанического общества (Петрозаводск, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы, состоящего из ... работ (из них ... на иностранных языках). Работа изложена на ... страницах (включая приложения), содержит ... таблиц и ... рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы изложен на ... страницах, состоит из 8 разделов, освещающих развитие листа, регуляцию развития и определение размеров листа, формирование системы транспорта фотоассимилятов и ее регуляцию, донорно-акцепторные отношения в растении. Рассмотрены способы деградации клеток, в том числе и автофагия, особое внимание уделено ультрамикроскопическому анализу состояния пластид.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Объекты исследования

В исследованиях использовали растения пестролистной бело-зеленой химеры *Ficus benjamina* L. сорта 'Starlight', а также генетически однородные растения *Ficus benjamina* L. сорта 'Daniel'. Сорт 'Starlight' имеет в пределах одного растения листья с различным соотношением зеленой и белой зон, но их постоянным расположением – зеленая находится в центре, белая – по краю листа. Сорт Daniel обладает зелеными листьями равномерной окраски. Исследования проводили на укорененных черенках в водной культуре, на 1- и 7-летних растениях в почвенной культуре.

2. Морфометрические исследования

Для определения положения листа в побеговой системе использовали понятие «порядок ветвления». Для растений, размножаемых вегетативно, невозможно установить абсолютный порядок ветвления, поэтому ввели следующие обозначения. Побег исходного черенка был условно принят за нулевой порядок. Все отходящие от него боковые ветви считали ветвями первого порядка, и т.д. Для каждого листа определяли длину, ширину, расстояние от основания листа до самой широкой его части. Эти параметры использовали для оценки площади листа; порядок ветви, на которой находится лист. Для первичной оценки соотношения зеленой и белой зон разбили все листья на 5 групп: I группа – 95 – 100 % зеленой зоны, II – 75 – 95% зеленой зоны, III – 50 – 75% зеленой зоны, IV – 25 – 50% зеленой зоны, V – 0 – 25% зеленой зоны. На растении измеряли морфометрические параметры каждого листа, указывали группу по соотношению белой и зеленой зоны и расположение листа на побеговой системе. Для точного определения соотношения зон в листе использовали изображения листьев, сделанные цифровой фотокамерой Olympus Camedia C-725 Ultra Zoom, Япония. Цифровые изображения анализировали на компьютере в программе Adobe Photoshop CS 8.

3. Световая микроскопия

Анатомическое строение листьев исследовали на поперечных срезах, сделанных бритвой. Временные срезы анализировали с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axioscope, Германия.

Организацию меристемы изучали на постоянных препаратах серий продольных срезов в парафине по стандартной методике, окраску проводили сафранином и гематоксилином по Деляфилду (Прозина, 1960; Барыкина и др., 2004). Препараты фотографировали цифровой камерой Axiosam MRC, встроенной в световой микроскоп Axioplan 2 Imagin, Германия.

4. Электронная микроскопия.

Для изучения ультраструктуры материал фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде в 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2); постфиксация в 1% тетроксиде осмия (OsO_4) и 2% уранилацетате (УА) в 70% этаноле. Затем ткани были обезвожены в возрастающих концентрациях этанола и ацетона. Препараты заключали в смесь эпоксидных смол следующего состава: 13 частей Епон 812, 8 частей DDSA, 7 частей MNA и 1 часть катализатора, ускоряющего процесс полимеризации (Уикли, 1975).

Изготовленные алмазным ножом на ультратоме LKB Ultratome V и монтированные на медных сетках ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнолдсу (Reynolds, 1963, по Уикли, 1975; Гайер, 1974). Образцы исследовали с помощью электронного трансмиссионного микроскопа JEM – 100В (Jeol) в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

5. Определение состава пигментов

Количественный состав пигментов определяли спектрофотометрическим методом по стандартной методике (Гавриленко, Жигалова, 2003). Из листьев пигменты экстрагировали 80%-ным ацетоном. Спектрофотометрию проводили на спектрофотометре SmartSpec 3000 при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов: 470, 646 и 663 нм. Расчет производили по формуле Лихтенталера (Lichtenthaler *et al.*, 1982):

$$c_a = 12,21D_{663} - 2,81D_{646},$$

$$c_b = 20,13D_{646} - 5,03D_{663},$$

$$c_{\text{кар}} = (1000D_{470} - 3,27c_a - 100c_b)/229,$$

где c_a - концентрация хлорофилла *a* (мг/л), c_b – концентрация хлорофилла *b* (мг/л), $c_{\text{кар}}$ - концентрация каротиноидов в мг/л, D_{470} , D_{646} , D_{663} - результаты измерений оптической плотности экстракта при соответствующих длинах волн. Расчет содержания пигментов на единицу площади листа проводили по следующей формуле: $A = Vc/1000S$,

где V - объем ацетонового экстракта (мл), c – концентрация пигмента в экстракте (мг/л), S – площадь анализируемой поверхности (cm^2).

Качественный состав пигментов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Кнауер (Германия) по стандартной методике (Pintea *et al.*, 2003).

6. Исследование функционального состояния фотосинтетического аппарата методом регистрации индукции флуоресценции хлорофилла

Для регистрации кривых индукции флуоресценции хлорофилла использовали установку, собранную на кафедре физиологии растений биологического факультета МГУ, а также флуориметр РАМ100 в институте физиологии растений им.Тимирязева РАН¹. При работе с установкой на кафедре физиологии растений использовали светофильтр СЗС-21, интенсивность светового потока на уровне отверстия - 550 мкмоль/м²*с. Исследования на флуориметре РАМ100 проводились при длине волны возбуждающего света 650 нм. Детектором флуоресценции служил фотодиод. Наличие перед фотодиодом светофильтра, пропускающего лучи с длиной волны более 700 нм предотвращало попадание на фотодиод рассеянного возбуждающего света. Частота модулированного света – 1,6 или 100 кГц. Все растения непосредственно перед измерениями проходили темновую адаптацию в течение 15-20 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анатомо-морфологические особенности закладки, развития и строения листа пестролистной химеры *Ficus benjamina* ‘Starlight’

1.1. Организация апикальной меристемы побега пестролистной химеры *Ficus benjamina* ‘Starlight’

Изучение организации апикальной меристемы побега показало, что к данному химерному объекту применима классическая концепция туники и корпуса, разработанная для цветковых растений (Эсау, 1969). Хотя число слоев туники у покрытосеменных варьирует от 0 до 6 (Romberger, 1963) и иногда изменяется в зависимости от объема меристемы (Тимонин, 1984), у *F.benjamina* сорта ‘Starlight’ туника представлена тремя слоями клеток (L1, L2, L3). На стадии закладки

¹ автор выражает благодарность Н.Г. Бухову за предоставленную возможность использования флуориметра

примордия граница между туникой и корпусом в проксимальной части примордия не выявляется в связи с глобальной переориентацией направлений клеточных делений, но на срезах в дистальной части развивающегося примордия различимы два слоя клеток, делящихся внутрь периклинально. Наличие стратифицированного апекса с отдельными слоями генетически разнородных клеток указывает на постоянство вклада зеленых и белых клеток в формирование примордия. Таким образом, вариабельность соотношений зон в листе обусловлена не пространственным распределением генетически разнородных клеток в меристеме, а другими параметрами, определяющими скорость пролиферации и растяжения генетически разнородных клеток.

1.2. Соотношение белой и зеленой зон в ходе роста раскрывшегося листа

У химеры *F. benjamina* 'Starlight' имеются листья с различным соотношением зеленой и белой зон. Показано, что в раскрывшемся листе на протяжении его дальнейшего роста контуры и соотношение площадей белой и зеленой зоны не меняются. Это позволяет сделать вывод о детерминации соотношения белой и зеленой зон в ходе развития примордия листа до его раскрытия. Кроме того, постоянное соотношение площадей зон и неизменность формы листа в процессе роста свидетельствует о равных скоростях роста зеленой и белой зон.

1.3. Анатомо-морфологическое строение листьев пестролистной химеры *Ficus benjamina* 'Starlight' и цельнозеленого сорта 'Daniel'

Анатомическое строение листа зеленого растения сорта Daniel типично для рода *Ficus* (Sonibare *et al.*, 2005). Эпидермис на верхней и нижней стороне однослойный. Устьица диацитного типа находятся на нижней стороне листа. На поверхности эпидермиса также имеются короткие простые волоски, окруженные 7-9 клетками. Эпидермис снаружи покрыт толстой кутикулой. Под эпидермисом находятся субэпидермальные слои с редкими хлоропластами, встречаются кристаллы клеточных включений. У фотосинтезирующей ткани с адаксиальной стороны лежит один слой столбчатого мезофилла, под ним расположен губчатый мезофилл.

Анатомическое строение листа химеры в целом сходно со строением листа генетически однородного сорта. Однако субэпидермальные клетки в некоторых местах делятся периклинально, образуя дополнительный внутренний слой, что не приурочено к зеленой либо белой зоне. В субэпидермальном слое как в белой, так и в зеленой зонах листа химеры встречаются редкие хлоропласты. При возбуждении флуоресценции зеленым светом ($\lambda=543$ нм) в этом слое наблюдали красное свечение хлорофилла. Мезофилл белой и зеленой зоны имеет строение, аналогичное строению мезофилла у сорта 'Daniel'.

В листьях сорта 'Starlight' кроме зеленой зоны в центре и белой каймы по краям можно наблюдать переходную зону бледно-зеленой окраски, расположенную между ними. Микроскопическое исследование выявило, что переходная зона образована как белыми, так и зелеными клетками мезофилла. В адаксиальный слой столбчатого зеленого мезофилла внедряется слой белой столбчатой фотосинтезирующей ткани, а клин зеленого губчатого мезофилла внедряется в толщу белого. Это говорит о независимой дифференциации мезофилла белой и зеленой зон.

Строение проводящей системы у листьев химеры и у зеленого сорта не различалось. Жилки листа у *F. benjamina* 'Starlight' идут непрерывно из белой в переходную и далее – в зеленую зону, что говорит о согласованном развитии проводящей системы в генетически разнородных клетках.

2. Влияние площади зеленой зоны в побеговой системе - донора фотоассимилятов на закладку белой зоны в примордии листа химеры *Ficus benjamina* 'Starlight'

2.1. Зависимость доли площади белой зоны в листе от его положения в побеговой системе

Для изучения корреляции между соотношением белой и зеленой зон в листе и его положением в побеговой системе растения определяли группы листьев, расположенных на ветвях различного порядка (см. п.2 в разд. «Объекты и методы исследования»). Для каждого из порядков ветвления были определены

преобладающие в них группы листьев. Процентное распределение различных групп листьев в побеговой системе представлено на рис. 1.

Рис. 1. Распределение листьев разных групп по порядкам ветвления в 7-летнем *F. benjamina* ‘Starlight’



В работе показано, что доля белой зоны в листе зависит от порядка ветви, на которой он находится. Чем выше порядок ветвления, тем выше доля белой зоны. Эти результаты были подтверждены

морфометрическими измерениями молодых 1-летних черенков, полученных от 7-летнего растения. У них наблюдалась та же закономерность, за исключением того, что ветви высоких порядков еще не были сформированы.

Очевидно, что у ветвей разных порядков роль листьев как доноров фотоассимилатов различается. Листья испытывают разную ассимиляционную нагрузку. Кроме того, листья, находящиеся ближе к главной оси, лучше снабжаются водой и минеральными солями, а отток фотоассимилатов у них может идти быстрее. По нашему мнению, все эти факторы оказывают влияние на соотношение белой и зеленой зон в листе.

2.2. Зависимость площади листа от соотношения белой и зеленой зон

У сорта ‘Starlight’ была выявлена положительная корреляция между долей зеленой зоны и площадью листа. Так, например, для группы I (относительная площадь зеленой зоны 95% и выше) средняя площадь листа составила $50 \pm 0,5$ см², а у группы V (0 – 25% зеленой зоны) – $23 \pm 0,2$ см².

Поскольку листья разных групп представлены неравномерно на осях разных порядков, площадь листа могла зависеть от его положения. Измерения площади листьев на побегах разного порядка у сорта ‘Daniel’ показали, что площадь листа

у генетически однородного растения не зависит от порядка ветвления и составляет $46 \pm 0,2 \text{ см}^2$.

2.3. Влияние суммарной площади ассимилирующей поверхности на долю белой зоны в образующихся на побеге листьях

Для изучения зависимости доли зеленой зоны от уже имеющейся ассимилирующей площади (суммарной площади зеленых зон развитых листьев побега в момент закладки нового листа), провели эксперимент с удалением боковых побегов. Изолированные побеги переносили в водную культуру и удаляли все боковые почки, чтобы предотвратить отток фотоассимилятов в боковые ветви.

Анализ изображений листьев экспериментальных побегов показал, что при увеличении суммарной зеленой поверхности побега новые листья имеют меньшую долю зеленой зоны. Таким образом, чем больше суммарная доля имеющейся фотоассимилирующей зоны, тем больше доля площади белой зоны в новом листе. Рост доли белой зоны имел колебательный характер, что можно объяснить недостаточной координацией между поступлением сигнала и ответными ростовыми процессами. В ответ на каждое последующее увеличение доли белой зоны происходило «выравнивание» доли зеленой зоны. Можно предположить, что метаболический сигнал от фотосинтезирующих листьев оказывает воздействие на ростовые процессы в листьях, формирующихся на побеге, и изменяет соотношение зеленой и белой зон.

2.4. Влияние света на соотношение зон в листе пестролистной химеры

Для выявления влияния экзогенных факторов на соотношение белой и зеленой зон в листе химеры был поставлен эксперимент с затенением изолированных побегов в водной культуре. Побеги были выращены при трех вариантах освещения: без затенения ($79 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$), со средним затенением ($35 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$) и с сильным затенением ($20 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$). Боковые побеги регулярно удаляли.

Средняя доля белой зоны в побегах, растущих при 79 , 35 и $20 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$ достоверно не различалась. При этом зависимость доли белой зоны в

формирующихся на побегах листьях так же, как и в предыдущем эксперименте, зависит от абсолютной суммарной площади зеленой зоны во всех имеющихся листьях на побегах (R^2 от 0,65 до 0,81). Это указывает на ключевую роль эндогенной регуляции соотношения зон в развивающемся примордии.

3. Характеристика зеленой зоны – донора фотоассимилятов

3.1. Количественный состав пигментов в зеленой зоне зрелых листьев *Ficus benjamina* ‘Starlight’ в сравнении со зрелыми листьями нехимерного *Ficus benjamina* ‘Daniel’

Содержание хлорофиллов a и b , а также суммарных каротиноидов в зеленой зоне пестролистной химеры снижено по сравнению с зеленым сортом ‘Daniel’: так, содержание хлорофилла a составляет $60,0 \pm 1,02$ % от такового в зеленом сорте, хлорофилла b – $57,5 \pm 0,69$ %, суммарных каротиноидов – $75,1 \pm 1,26$ %. Однако, отношение a/b в зеленой зоне увеличено – 2,96 против 2,83 в сорте ‘Daniel’. Доля суммарных каротиноидов также несколько увеличена и составляет 14% против 11% у ‘Daniel’. Выявленные отличия могут быть связаны с сортовыми особенностями.

3.2. Характеристика функционального состояния фотосинтетического аппарата в зеленой зоне листьев пестролистной химеры *F.benjamina* ‘Starlight’ и цельнозеленого *F.benjamina* ‘Daniel’

Функциональное состояние фотосинтетического аппарата в зеленой зоне пестролистного фикуса, а также в листьях сорта 'Daniel' было охарактеризовано методом индукции флуоресценции. Квантовая эффективность работы ФСII в зеленой зоне пестролистного растения ниже, чем в зеленом сорте 'Daniel' - $0,54 \pm 0,03$ против $0,68 \pm 0,01$ соответственно. Снижены и другие параметры индукционной кривой, в особенности F_v и F_m .

Нами было показано отсутствие зависимости функциональной активности фотосинтетического аппарата в зеленой зоне листа химеры от доли белой зоны. При интенсивности $330 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$ были сделаны измерения на листьях 1, 3 и 5 групп среднего яруса *F.benjamina* ‘Starlight’. Достоверных различий в квантовом выходе, фото- и нефотохимическом тушении, фотосинтетическом электронном

транспорте нет, следовательно, различий в активности фотосинтетического аппарата листьев разных групп нет. Это означает, что у *F. benjamina* реализуются другие возможности регуляции продукции фотоассимилятов, например, за счет ростовых процессов.

3.3 Характеристика ультраструктуры хлоропластов зеленой зоны молодых и зрелых листьев

Клетки мезофилла зеленой зоны молодого листа имеют обычный набор органелл, целостность мембран не нарушена. Хлоропласты зеленой зоны занимают значительную часть площади клетки на срезе (до 50%), все они обладают крупными каплями с низкой электронной плотностью, занимающими значительную часть хлоропласта (20% и более). Это указывает на участие хлоропластов зеленой зоны в синтетических процессах, возможно, связанных со вторичным метаболизмом. Тилакоидные мембраны плотно компактизированы, расстояние между мембранами мало. Структура хлоропластов гранальная. Изредка встречаются крахмальные зерна, их доля от общей площади хлоропласта на срезе мала (1-2%). Для некоторых клеток характерны группы, состоящие из хлоропластов, митохондрий и пероксисом. Все эти факты указывают на высокую функциональную активность хлоропластов, жизнеспособность клеток мезофилла зеленой зоны, а также на их высокую метаболическую активность.

Зеленая зона зрелого листа обладает хлоропластами меньшего размера, чем в молодом листе, они не имеют капель с низкой электронной плотностью, крахмальные зерна не встречаются. Отсутствие крахмальных зерен указывает на высокий экспортный отток фотоассимилятов, связанный с появлением дополнительного акцептора фотоассимилятов (белой зоны) в пределах зрелого листа.

4. Функциональная активность фотосинтетического аппарата белой зоны листа

4.1. Количественный состав пигментов в белой зоне зрелых листьев *Ficus benjamina* ‘Starlight’

Содержание хлорофиллов *a* и *b* в белой зоне сильно снижено по сравнению с зеленой. Так, содержание хлорофилла *a* составляет $1,36 \pm 0,02$ мкг/см² против $12,30 \pm 0,21$ мкг/см² в зеленой зоне, хлорофилла *b* – $0,79 \pm 0,02$ мкг/см² против $4,16 \pm 0,05$ мкг/см². Доля хлорофилла *a* при этом значительно снижена по сравнению с зеленой зоной и генетически однородным сортом и составляет 1,71 против 2,96 в зеленой зоне и 2,83 у сорта ‘Daniel’. Соотношение хлорофиллов *a* и *b* является важным параметром, отражающим относительные доли двух фотосистем – поскольку хлорофилл *b* по большей части ассоциирован с ФСII, а хлорофилл *a* – с ФСI, и, соответственно, характеризующим структурное состояние фотосинтетического аппарата (Мокроносов и др., 2006). Доля хлорофилла *a* в белой зоне снижена, что может говорить об измененном соотношении фотосистем в пластидах белой зоны.

В белой зоне отмечено наиболее высокое отношение каротиноидов к хлорофиллам. Очевидно, это связано с фотопротекторной функцией каротиноидов при действии высоких интенсивностей освещения.

4.2. Характеристика функционального состояния фотосинтетического аппарата в белой зоне листьев пестролистной химеры *F.benjamina* ‘Starlight’

Таблица 1

Параметры индукционной кривой флуоресценции хлорофилла листьев *F.benjamina* ‘Starlight’ (средние из 200 измерений)

Параметры	зеленая зона	белая зона	Соотношение параметров, белая зона/зел.зона, %
F ₀ , мм	22,25± 1,06	10,33± 0,86	46,43
F _v , мм	30,25± 3,16	11,38± 2,62	37,62
F _m , мм	48,88± 2,79	20,00± 1,48	40,92
F _v /F ₀	1,36± 0,14	1,01± 0,12	74,26

(Fm-Fo)/Fm	0,54± 0,03	0,50± 0,03	92,59
------------	------------	------------	-------

Функциональное состояние фотосинтетического аппарата в белой зоне пестролистного фикуса было охарактеризовано методом индукции флуоресценции. Данные анализа кривых индукции флуоресценции, полученные на листьях среднего яруса пестролистной химеры, приведены в таблице 4.1. Абсолютные параметры индукционной кривой для белой зоны снижены в сравнении с зеленой, однако относительные показатели, такие, как (Fm-Fo)/Fm, характеризующий квантовый выход, и Fv/Fo, близки к значениям, полученным для зеленой зоны. Это характеризует хлоропласты белой зоны пестролистной химеры как функционально активные, и говорит о том, что фотосистема II функционирует в белой зоне практически с такой же квантовой эффективностью, что и в зеленой.

4.3. Характеристика ультраструктуры клеток мезофилла белой зоны молодых и зрелых листьев

Белая зона молодого листа характеризуется небольшими (5-7% от общей площади клетки на срезе), очень редкими хлоропластами преимущественно агранальной структуры. На полученных нами срезах хлоропласты встречались с частотой примерно один на каждые 20 клеток на площадь среза. В отдельных хлоропластах тилакоидные мембраны довольно далеко отстоят друг от друга. Имеются крупные крахмальные зерна (от 8 до 50% от площади хлоропласта), в отдельных хлоропластах встречаются электронно-плотные липидные капли (3-30% от площади), являющиеся пластоглобулами или пластоглобуло-подобными частицами. Это может указывать на высокую синтетическую активность хлоропластов белой зоны молодого листа (Austin *et al.*, 2006) и, с другой стороны, на накопление продуктов катаболизма мембран тилакоидов, фотопротекторных соединений и начало литических процессов. В митохондриях изредка встречаются электронно-плотные липидные капли. Клетки мезофилла белой зоны молодого листа имеют обычный набор органелл, целостность мембран не нарушена. В белой зоне зрелого листа пластид не встречено, клетки мезофилла при этом деградируют (см. 5.1.).

5. Цитологические особенности клеток белой и зеленой зон листьев разного возраста

5.1. Возрастная динамика состояния клеток мезофилла белой и зеленой зон

Как было отмечено выше, белая зона молодого листа обладает жизнеспособными клетками с функционально активными хлоропластами. Однако в конце стадии роста листа растяжением клетки мезофилла белой зоны начинают деградировать. Нами показано, что лист пестролистной химеры *F. benjamina* 'Starlight' заканчивает рост растяжением через 11-12 дней после разворачивания из почки. Методом ТЭМ показан начинающийся процесс деградации в белой зоне листьев через 10 дней после раскрытия почки. Для этого этапа развития клеток белой зоны характерно образование крупных литических вакуолей, пристеночного слоя цитоплазмы, формированием групп митохондрий и появление электронно-плотных капель в них. При этом среди клеток мезофилла встречаются хлоропласты с крахмальными зёрнами (без признаков деградации). В листьях возраста 30 и более дней выявлен процесс частичной деградации клеток мезофилла: появляются крупные вакуоли с остатками клеточных структур, в результате деградации пластид возникают «миелиноподобные» структуры (Douce, Joyard, 1980). При этом образуются стопки из 4-5 штук тесно прижатых друг к другу митохондрий. Можно предположить, что белая зона зрелого листа испытывает углеводное голодание, что ведет к полной или частичной деградации клеток. Похожая картина описана при анализе автофагии клеток *Acer pseudoplatanus* L. в условиях углеводного голодания (Aubert *et al.*, 1996). Следует отметить большую временную длительность этих процессов – через 95 дней после раскрытия листа содержимое клеток мезофилла полностью не деградирует, что гораздо выше сроков деградации в приведенных ссылках (не более 7 дней).

5.2. Электронно-микроскопические особенности метаболизма клеток белой и зеленой зон

Нами показано, что пластиды, встречающиеся в белой зоне молодых листьев, обильно накапливают крахмал в виде зёрен (до 27% от площади пластиды на срезе). Для них же обычны электронно-плотные капли, предположительно

пластоглобулы, занимающие довольно большую площадь – до 37% от площади пластиды на срезе. Доля хлоропластов от площади клетки мала – до 7% на срезе.

Хлоропласты зеленой зоны молодых листьев иногда имеют редкие крахмальные зерна малого размера – до 2,4% от площади хлоропласта на срезе. Практически во всех хлоропластах имеются крупные электронно-прозрачные липидные капли – до 31,3% от площади хлоропласта на срезе.

Примечательно, что в зеленой зоне в составе пластид встречаются исключительно электронно-прозрачные капли, а в белой зоне – только электронно-плотные. Это указывает на метаболические особенности генетически разнородных белой и зеленой зон. Но, возможно, между двумя зонами листа может существовать разделение синтетических функций.

5.3. Гетерогенность клеток белой зоны в пределах одной ткани

Можно отметить гетерогенность деградации в пределах белой зоны одного листа. Нами было обнаружено, что клетки мезофилла, контактирующие с проводящими тканями, находятся на более ранней стадии деградации, чем клетки, не контактирующие с проводящим пучком. Так, в 30-дневном листе клетки мезофилла, находящиеся вблизи флоэмных элементов, имеют уровень деградации, более характерный для отдаленных от флоэмы участков мезофилла 10-дневных листьев. Это говорит в пользу нашей гипотезы об углеводном голодании как о причине деградации мезофилла. Не зависимо от направления потока сахаров – в белую зону или из нее – через передаточные клетки мезофилла (клетки обкладки в терминологии Гамалея (2004)) проходят фотоассимиляты, что приостанавливает деградацию клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В природе и среди культурных растений известно немало пестролистных форм. Однако причины пестролистности могут быть различны. Часто это связано с дефектами в цепи биосинтеза хлорофилла, однако известны и другие причины, такие как, например, фотодеструкция зеленых пигментов (Takahashi *et al.*, 2002). Ультраструктурные особенности хлоропластов белой зоны, идентичность качественного состава пигментов в белой и зеленой зонах листа химеры и

отсутствие продуктов деградации хлорофилла *a* и *b* свидетельствуют о том, что биосинтез пигментов у *F.benjamina* 'Starlight' не нарушен. В белой зоне листа химеры фотодеструкция также не наблюдается, а хлоропласты функционально активны.

Таким образом, как нами впервые показано, белый фенотип *F.benjamina* 'Starlight' объясняется снижением числа хлоропластов на клетку в процессе развития листа.

Электронно-микроскопические исследования показали частичную деградацию содержимого клеток мезофилла в белой зоне, начинающейся практически сразу после окончания роста листа растяжением. Пластиды и эндоплазматический ретикулум деградируют с образованием миелиноподобных структур (Douce, Joyard, 1980; Гамалей, 2004), формируются электронно-плотные пластоглобулы, и в зрелом листе белый мезофилл не содержит хлоропластов. В таком состоянии белая зона, безусловно, является нефотосинтезирующей тканью и может быть акцептором фотоассимилятов. Нами была дана характеристика фотосинтетического аппарата зеленой зоны листа химеры *F.benjamina* 'Starlight'. Зеленая зона обладает функционально активным фотосинтетическим аппаратом, что было показано методами индукции флуоресценции, электронной микроскопии, а также количественным определением пигментов. Несомненно, зеленая зона является полноправным источником фотоассимилятов для нефотосинтезирующих частей растения.

Для пестролистных бело-зеленых растений отмечена способность зеленой ткани компенсировать отсутствие фотосинтеза в белой за счет приобретения параметров, характерных для «световых» листьев (Aluru *et al.*, 2001). Данная работа сделана на мутанте по ядерному гену, рисунок листа и соотношение зон неизменно и, т.о., морфологическая компенсация наличия белой зоны не реализуется. Пестролистные бело-зеленые химеры обладают, по сути, автотрофной и гетеротрофной тканями в пределах одного органа – листа и проявляют большую вариабельность развития, чем генетически однородные растения (Dulieu, 1967; Pohlheim, 1973). Таким образом, пестролистные химеры представляют удобную модель для изучения морфологической и физиологической компенсации ослабления донорной функции в пределах целого

листа. Вариабельность развития зачастую связана с координацией клеточных делений и растяжений при формировании органа. Так, *F. benjamina* 'Curly' формирует деформированную листовую пластинку, вероятно, в связи с неоднородностью ростовых процессов в белой и зеленой зонах (Лабунская, 2007). Однако сорт 'Starlight' имеет форму листа, соответствующую генетически однородному сорту, т.е., пролиферация и растяжение клеток разных зон при формировании листа скоординированы. Вариабельность развития и автономность зеленых и белых клеток проявляется на стыке зеленой и белой зон, где автономно формируются два слоя столбчатого мезофилла вместо одного.

Пестролистная химера *F. benjamina* 'Starlight' имеет листья с разным соотношением зеленой и белой зон в пределах одного растения. Нами была показана независимость доли белой зоны в листьях пестролистной химеры от интенсивности освещения. Более того, квантовый выход эффективности функционирования фотосистемы II не зависит от соотношения зон в листе, Это указывает на регуляцию продукции фотоассимилятов другими способами, в частности, изменением доли фотоассимилирующей поверхности в листе и в целом растении.

Для понимания причин и роли вариабельности соотношения зон в листе необходимо было охарактеризовать структуру меристемы и закладку примордия листа. Так, в работе было показано, что апикальная меристема побега пестролистной химеры сорта 'Starlight' обладает тремя слоями туники и корпусом, что означает наличие отдельных клеточных генетически разнородных линий, равноправно участвующих в закладке примордия листа, что характерно для периклиналиных химер. Таким образом, вариативное соотношение зон в листе не связано с различными начальными порциями зеленых и белых клеток в примордии. Мы также показали, что соотношение зон в листе определяется до момента разворачивания листа, т.е., при закладке примордия (Лабунская и др., 2007). Следовательно, есть факторы, влияющие на пролиферацию и/или растяжение клеток будущих зон листа. Известны множественные примеры различий в параметрах клеточного цикла генетически разнородных клеток (Marcotrigiano, Bernatzky, 1995; Marcotrigiano, 2001). В последние годы выявлено влияние развития пластид на морфологию клетки (Chatterlee et al., 2007),

структуру листа (Ahlert *et al.*, 2003) и даже на эмбриогенез целого растения (Berg *et al.*, 2005; Baldwin *et al.*, 2005). Однако до сих пор не была показана возможность регуляции пролиферации или растяжения клеток меристемы или примордия какими-либо эндогенными параметрами. Для растущего раскрывшегося листа показана прямая связь между доступностью сахаров и интенсивностью ростовых процессов (Wiese *et al.*, 2007), роль сахаров как тонких регуляторов состояния клетки в последнее время активно обсуждается (Aubert *et al.*, 1996; Toyooka, 2001; Walter *et al.*, 2003; Wiese *et al.*, 2007; Usadel *et al.*, 2008; Wingler *et al.*, 2009). В нашей работе показано, что формирование определенной зоны фотоассимилирующей поверхности в примордии напрямую зависит от имеющейся суммарной фотосинтезирующей поверхности во всех листьях растения одного порядка: при накоплении зеленой суммарной площади доля зеленой зоны в каждом новом листе становится меньше (Лабунская и др., 2007). Таким образом, продукция фотоассимилятов в растении оказывает влияние на пролиферацию клеток генетически разнородных зон в примордии. Следует также обратить внимание на поддержание оптимального соотношения зон в листьях обильно ветвящегося растения: мы выяснили, что наиболее часто встречающееся соотношение зон в листе – 50 – 75% зеленой зоны. При черенковании уже через год молодое растение формирует крону, где преобладают листья с тем же оптимальным соотношением, хотя на исходном черенкованном побеге были более белые листья. Можно предположить, что меристема при закладке примордия реагирует на некоторый метаболический сигнал, поступающий от фотосинтезирующих органов, что определяет соотношение зеленой и белой зон в примордии нового листа и дальнейшую продукцию фотоассимилятов в растении.

Донорно-акцепторные отношения оказывают серьезное влияние и на функциональное состояние клеток разных зон в пределах одного листа. Растущий лист исходно является акцептором фотоассимилятов, но по достижении 60 – 90% от своей максимальной площади акцепторная функция сменяется донорной (Мокроносов, 1983). При этом поток сахаров в листе однонаправлен – он ориентирован либо на разгрузку флоэмы, либо на ее загрузку, одновременный приток сахаров и их отток по проводящей системе невозможен (Turgeon, 2006). Смена акцепторно-донорного статуса влияет на состояние мезофилла белой зоны:

в акцепторный период роста листа белая зона жизнеспособна, содержит хлоропласты с крахмалом. Накопление крахмала часто является одним из признаков нарушения оттока фотоассимилятов у симпластных растений, однако при этом коллапс клеток происходит по градиенту от терминальных комплексов флоэмы к удаленным участкам мезофилла (Гамалей. 2004), а не наоборот, как это происходит далее у нас. Возможно, накопление крахмала связано с более ранней дифференциацией клеток мезофилла белой зоны и переходом их к активному фотосинтезу, поскольку край листа (Tsukaya, 2005) и пластиды в его мезофилле (Walter *et al.*, 2004) дифференцируются раньше центральной зоны. При этом лист еще находится в акцепторной фазе. Переход к донорному статусу происходит в конце фазы растяжения, и в нашей работе показано начало процессов деградации именно на этом этапе. Далее в зрелом листе эти процессы развиваются по типу автофагии, однако их протекание сильно замедленно (месяцы, а не дни, как это показано в ряде работ (Aubert *et al.*, 1996; Toyooka, 2001)). Это свидетельствует о снабжении белой зоны фотоассимилятами. Однако массовый ток сахаров направлен на экспорт из листа, и дополнительный приток фотоассимилятов из других листьев мало вероятен. Очевидно, что в системе зрелого листа зеленая зона функционирует как донор, а белая – как акцептор фотоассимилятов. При этом нагрузка на фотосинтетический аппарат зеленой зоны повышена, что подтверждается исчезновением крахмальных зерен в зеленой зоне зрелого листа по сравнению с молодым. Кроме того, уровень растворимых сахаров в белой зоне листа через 5 месяцев после раскрытия составляет 20% от зеленой зоны. Эти данные указывают на донорно-акцепторные взаимодействия автотрофной и гетеротрофной зон в пределах листа.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что зеленая зона листа пестролистной химеры *Ficus benjamina* 'Starlight' обладает полным составом фотосинтетических пигментов. Выявлено наличие функционально активных хлоропластов гранальной структуры. Это позволяет считать зеленую зону донором фотоассимилятов.
2. Функциональная активность хлоропластов в белой зоне листа *Ficus benjamina* 'Starlight' доказана рядом независимых методов (анализ пигментного

состава, ультраструктурных признаков и индукции флуоресценции хлорофилла). В мезофилле белой зоны зрелого листа пластид не обнаружено. Выявлены литические процессы, схожие с автофагией при углеводном голодании.

3. Показано, что в апикальной меристеме побега химеры *Ficus benjamina* 'Starlight' есть трехслойная туника, в которой слои L1 и L3 являются инициалами зеленых клеток, а слой L2 производит белые клетки. Вариабельность соотношения зон в листе определяется регуляторными событиями на уровне примордия листа. Соотношение зон в листе и их контуры после разворачивания листа не меняются.

4. При развитии примордия листа рост генетически разнородных клеток в длину и ширину скоординирован. Обнаружено, что дифференциация мезофилла на столбчатый и губчатый в генетически разнородных группах клеток происходит автономно.

5. Выявлена зависимость состояния клеток мезофилла белой зоны от донорно-акцепторного статуса листа. Начало литических процессов коррелирует со сменой акцепторной функции листа на донорную и с замедлением роста. В пределах зрелого листа высокий отток сахаров из зеленой зоны выражается в исчезновении крахмальных зерен. Доказано снабжение белой зоны зеленой фотоассимилятами.

6. Обнаружено, что соотношение зон в листе пестролистной химеры *Ficus benjamina* 'Starlight' не зависит от интенсивности освещения. Выявлена эндогенная регуляция соотношения зеленой и белой зон в примордии по принципу обратной связи: с увеличением суммарной фотоассимилирующей площади всего растения возрастает доля белой зоны при закладке каждого нового листа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Статьи в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации соискателей ученой степени кандидата наук.

1. Лабунская Е.А., Жигалова Т.В., Чуб В.В. Анатомическое строение листа пестролистного *Ficus benjamina* сорта 'Starlight' и взаимное влияние

фотосинтезирующего и акцепторного компонентов химеры. // Онтогенез. 2007. Т. 38. №6. С. 471-480

2. **Лабунская Е.А.** Откуда у фикуса пестрые листья. // Цветоводство. 2007. № 6. С. 52 – 55

II. Прочие публикации.

3. **Лабунская Е.А.** Пестролистные химеры как модель для изучения донорно-акцепторных отношений у растений. Материалы докладов XII молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии». Сыктывкар, 4-7 апреля 2005 г.. С. 129-130

4. **Лабунская Е.А.** Зависимость соотношения зеленой и белой зон в листьях пестролистной химеры *Ficus benjamina* 'Starlight' от метаболического сигнала: анатомо-морфологический анализ. Материалы I(IX) Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге. Санкт-Петербург, 21-26 мая 2006 г. С. 163-164

5. **Лабунская Е.А., Чуб В.В., Жигалова Т.В.** Регуляция соотношения автотрофной и гетеротрофной ткани в процессе развития химерного листа *Ficus benjamina* 'Starlight'. VI Съезд Общества физиологов растений России и Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктывкар, 18–24 июня 2007 г. Материалы докладов. Часть 1. С. 313-314

6. **Labunskaya E.A., Leonteva M.R., Choob V.V.** Interaction of source and sink components in the green-white chimera *Ficus benjamina* cv.'Starlight'. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), Tampere, Finland, 17-22 August 2008. FESPB 2008 abstracts in: Physiologia Plantarum. 2008. V. 133. N3. P06-034

7. **Лабунская Е.А., Леонтьева М.Р., Чуб В.В.** Сравнительный анализ ультраструктуры пластид белой и зеленой зон пестролистной химеры *Ficus benjamina* cv.'Starlight'. XII Съезд Русского ботанического общества и Всероссийская конференция «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века, Петрозаводск, 22-27 сентября 2008 г. Материалы конференции. Часть 6. С. 69-70