

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.8:581.452

АНАТОМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ЛИСТА ПЕСТРОЛИСТНОГО
Ficus benjamina СОРТА Starlight
И ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕГО
И АКЦЕПТОРНОГО КОМПОНЕНТОВ ХИМЕРЫ

© 2007 г. Е. А. Лабунская, Т. В. Жигалова, В. В. Чуб

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: styx_elenalab@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.2006 г.

Окончательный вариант получен 25.01.2007 г.

Проведено сравнительное исследование анатомического строения листа пестролистной химеры *Ficus benjamina*, сорт Starlight и зеленого листа *F. benjamina*, сорт Daniel. У пестролистной химеры показано наличие двух, иногда трех субэпидермальных слоев; столбчатый мезофилл в белой и зеленой зонах однослойный, а в переходной он образует два слоя из мутантных (белых) и нормальных (зеленых) клеток. В переходной зоне зеленый губчатый мезофилл находится между двумя слоями белой губчатой ткани, доля фотосинтезирующих клеток варьирует. В клетках мутантной ткани число хлоропластов значительно снижено. У зеленого сорта Daniel субэпидермальных слоев два, а клетки столбчатого мезофилла расположены в один слой. Морфометрические исследования показали, что доля белой зоны в листе коррелирует с положением листа в побеговой системе: чем больше порядок ветви, на которой находится лист, тем больше доля белой зоны. От положения листа в побеговой системе зависит также его суммарная площадь. У сорта Daniel не выявлено корреляции между положением листа в побеговой системе и его площадью. По-видимому, у пестролистной химеры от положения листа в побеговой системе зависит его донорно-акцепторный статус. опыты с отделенными побегами одного порядка при удалении всех боковых побегов показали, что по мере накопления суммарной площади зеленой зоны увеличивается доля белой зоны в новых листьях на побеге. Таким образом, площадь ассимилирующей поверхности побега влияет на формирование листьев в меристеме. Выдвинута гипотеза о том, что соотношение зон в формирующихся листьях контролируется донорно-акцепторными отношениями, складывающимися в растении. Возможно метаболическим сигналом, действующим на меристему, являются продукты фотосинтеза (сахара). Не исключено также, что у химерного растения изменяется гормональный статус.

Ключевые слова: химеры, пестролистность, развитие листа, анатомия листа, *Ficus benjamina*, донорно-акцепторные отношения.

В биологии термин “химера” используется для обозначения организмов, состоящих из генетически неоднородных тканей. Впервые его применил немецкий ботаник Винклер в 1907 г. для обозначения форм растений, полученных в результате сращивания паслёна и томата (Кренке, 1947). Далее Баур в 1909 г., работая с *Pelargonium zonale* L’Hér., предположил наличие генетически независимых слоев клеток в апикальной меристеме химер (Джонс, 1936). Первые эксперименты по получению цитохимер *Datura stramonium* L., в меристеме которых клеточные слои отличались по плоидности, подтвердили наличие трех генетически независимых слоев в апикальной меристеме – L1, L2, L3, участвующих в формировании различных органов и тканей растения (Satina et al., 1940 – цит. по: Эсау, 1969).

Пестролистные бело-зеленые (вариегатные) химеры занимают важное место среди химер в анатомо-морфологических исследованиях. Мутации, которые связаны с формированием фотосинтетического аппарата и биосинтезом хлорофилла, дающие белый или желтый фенотип, удобны для исследования закладки и образования различных органов. Такие химеры являются удобной моделью для изучения структуры апикальной меристемы и закладки примордиев листьев. Пестролистные химеры получают (или используют имеющиеся) в рамках метода клонального анализа (Poethig, 1987). С их помощью были детально исследованы особенности функционирования апикальной меристемы *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L., *Tradescantia* sp. (см. обзор: Poethig, 1987), а также судьба клеточных слоев туники во многих родах одно-

дольных (Stewart, Dermen, 1979). При этом было показано, что судьба меристематических клеток детерминирована не жестко, особенно у пестролистных химер, где вариабельность развития может быть связана с разной скоростью делений генетически разнородных клеток (Dulieu, 1967; Pohlheim, 1973, 1983 – цит. по: Poethig, 1987).

Неоднородность ростовых процессов у пестролистных химер можно наблюдать по изменению рисунка листа и по распределению ассимилирующих (зеленых) и акцепторных (белых) тканей. В случае мериклиальных и секториальных химер появление разных рисунков листьев на одном растении обусловлено изменением расположения мутантных клеток в меристеме. Возникновение хаотически разбросанных зеленых пятен по белой кайме листа связано со сменой ориентации делений эпидермального слоя: в этом случае клетки дифференцируются как фотосинтетические и их текущая позиция имеет большее значение, чем принадлежность к определенной клеточной линии меристемы (Szymkowiak, Sussex, 1996). У периклиальных бело-зеленых химер расположение белой и зеленой зон в меристеме постоянно, но их контуры в зрелых листьях могут меняться, влияя на соотношение площадей фотоассимилирующей и акцепторной зон. Очевидно, что это соотношение зависит от ростовых процессов, однако до сих пор не выяснено, какие факторы могут оказывать на них воздействие. Возможно, в случае периклиальных бело-зеленых химер ростовые процессы в примордии листа зависят от количества сахаров, производимых зрелыми листьями, и донорно-акцепторные отношения, связанные с продукцией и потреблением фотоассимилятов, определяют рисунок листа в процессе развития.

Ведущую роль донорно-акцепторных отношений в регуляции ростовых процессов и в организации и функционировании фотосинтетического аппарата растений следует признать установленной (Мокроносков, 1983). Однако влияние химерности на анатомию фотосинтезирующих тканей листа на сегодня изучено недостаточно. В пределах одного листа химерных растений часто можно обнаружить зоны различного анатомического строения (Джонс, 1936). Так, отдельные участки листовой пластинки химер окрашены не только в белый и зеленый, но и в светло-зеленый цвет (переходная зона).

Вместе с тем пестролистны химеры могут служить удобным объектом для исследования роли донорно-акцепторных отношений в становлении морфофизиологических признаков у растений.

В нашей работе исследован ряд анатомо-морфологических признаков у *Ficus benjamina* L., для которого получены многочисленные пестролистны сорта с различной шириной белой каймы,

разнообразным рисунком и окраской мутантных клеток, варьирующей от белой до желтой и светло-салатной (см. базы изображений растений и их описаний: NOS FICUS PAGE: http://members.tripod.com/~Hatch_L/ficu888.html; Plantscope: www.plantscope.nl). Разнообразие химер с различными комбинациями рисунка листа, в том числе и у *Ficus*, см. также: Tilney-Basset, 1986. Полная информация по биологии, таксономии, распространению *Ficus benjamina* представлена на сайте Plants of Hawai'i Reports: http://www.hear.org/start/hiplants/reports/html/ficus_benjamina.htm.

Наиболее удобным объектом оказался сорт *F. benjamina* Starlight, являющийся бело-зеленой периклиальной химерой. У этого сорта листья имеют варьирующее соотношение площадей белой и зеленой зон, причем белая зона всегда находится на периферии листа. В качестве контроля был взят зеленый сорт *F. benjamina* Daniel.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали растения *F. benjamina* сортов Starlight и Daniel, размноженные черенкованием 7 лет назад. Были измерены все живые листья, при этом фиксировался порядок ветви, на которой располагался лист. Для растений, размножаемых вегетативно, невозможно установить абсолютный порядок ветви, соответствующий главной оси зародыша, поэтому ввели условное обозначение порядков ветвления. Так, побег исходного черенка был условно принят за нулевой порядок. Все отходящие от него ветви условно считали первым порядком, от них отходят ветви второго порядка и т.д.

Определяли следующие параметры листа: длину; ширину; расстояние от основания листа до самой широкой части; порядок ветви, на которой находится лист. В листьях пестролистной химеры исследовали соотношение площадей белой и зеленой зон. При этом использовали фотографические изображения листьев, сделанные цифровой фотокамерой Olympus Camedia C-725 Ultra Zoom, Япония. Цифровые изображения анализировали на компьютере в программе Adobe PhotoShop CS 8; положительный опыт использования цифровой фотографии и дальнейшей ее обработки в программе Photoshop для анализа цветового узора листьев хорошо описан (Шимои и др., 2006).

Для оценки площади лист *F. benjamina* принимали за эллипс, определяя ее по формуле: $P = \pi ab$, где P – площадь эллипса (листа), a и b – радиусы эллипса, перпендикулярные друг другу и проведенные вдоль осей его симметрии (b – ширина листа, a – удвоенная длина от основания до самой широкой части листа). Погрешность при этом постоянна, поскольку связана с более или менее постоянной формой листа, а также с систематиче-

ской погрешностью измерительного прибора. Это позволяет достаточно адекватно сравнивать площадь листьев, не производя громоздких вычислений и замеров.

Анатомическое строение листьев исследовали на поперечных срезах, сделанных бритвой. Для выяснения особенностей строения листа сорта Starlight делали срезы, проходящие через белую, зеленую и переходную зону. Временные срезы анализировали с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axioscope, Германия.

Организацию меристемы изучали на постоянных препаратах серий поперечных срезов. Для этого брали почки преимущественно с ветвей первого порядка и выделяли меристемы, освобождая по возможности от листьев и прилистников и фиксируя в 70%-ном этаноле. Далее меристемы заключали в канадский бальзам по стандартной методике (Прозина, 1960; Барыкина и др., 2004). Вначале материал обезжировали в спиртах восходящей концентрации (по два раза в 96 и 100%-ном по 1 и 1.5 ч соответственно). Затем обезжиренный материал переводили в ксилол через смеси этанола и ксилола в соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3 и две смены ксилола, выдерживая в каждом растворе по 1 ч. После проведенных процедур материал пропитывали парафином в термостате при температуре 56°C, в парафин добавляли 5% пчелиного воска. Потом материал заливали в парафиновые блоки и резали на ротационном микротоме при толщине среза 20 мкм. Полученные ленты срезов монтировали на предметные стекла. Парафин удаляли ксилолом, далее препарат переводили в 96%-ный спирт и промывали дистиллированной водой. Окраску препаратов проводили сафранином, удаляя избыток красителя водой. Затем препараты окрашивали гематоксилином по Деляфильду в течение 5 мин. Отмывку проводили дистиллированной водой и слабым раствором аммиака.

Препараты фотографировали цифровой фотокамерой Axiosam MRC, встроенной в микроскоп AxioPlan 2 Imagin, Германия. Флуоресценцию хлорофилла на временных препаратах изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Karl Zeiss LSM510Meta, Германия. Качественный состав пигментов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по стандартной методике (Pintea et al., 2003).

Количественный состав пигментов определяли спектрофотометрическим методом по стандартной методике (Гавриленко, Жигалова, 2003). Из листьев пигменты экстрагировали 80%-ным ацетоном. Спектрофотометрию осуществляли на спектрофотометре SmartSpec 3000 при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов: 470, 646 и 663 нм. Для расчета исполь-

зовали формулы Лихтенталера (Lichtenthaler et al., 1987):

$$c_a = 12.21D_{663} - 2.81D_{646},$$

$$c_b = 20.13D_{646} - 5.03D_{663},$$

$$c_{\text{кар}} = (1000D_{470} - 3.27c_a - 100c_b)/229,$$

где c_a , c_b , $c_{\text{кар}}$ – концентрации хлорофилла a и b , а также каротиноидов соответственно, 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, см².

Для изучения зависимости доли белой (нефотосинтезирующей) зоны в формирующихся листьях от суммарной ассимилирующей площади с 7-летнего растения *F. benjamina* Starlight отбирали побеги с пятью листьями и приблизительно одинаковой ассимилирующей площадью. Черенки выращивали в водной культуре, все закладывающиеся боковые побеги удаляли, чтобы исключить отток фотоассимилятов к боковым меристемам. Через 3 мес листья каждого побега сканировали, а их цифровые изображения анализировали в программе PhotoShop. Рассчитывали площадь каждого листа и площади зеленой и белой зон, соотнося число пикселей в соответствующих зонах с их эталонным числом в 1 см².

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анатомическое строение листа F. benjamina сортов Daniel и Starlight. Листья зеленого растения сорта Daniel имели анатомическое строение, типичное для рода *Ficus* (рис. 1, а). Эпидермис на верхней и нижней сторонах листа однослойный, состоит из слегка вытянутых клеток небольшого размера. Устьица диацитного типа находятся на нижней стороне листа. Кроме устьичного аппарата на поверхности эпидермиса имеются короткие простые волоски, окруженные 7–9 клетками. Снаружи эпидермис покрыт довольно толстой кутикулой. Под эпидермисом находятся субэпидермальные слои: на адаксиальной и абаксиальной сторонах листа имеется слой крупных клеток линзовидной формы примерно равного размера с малым количеством хлоропластов. В субэпидермальном слое встречаются крупные кристаллы клеточных включений. В этом случае клетка, содержащая кристалл, имеет больший размер, высотой 100–120 мкм, что соответствует двум субэпи-

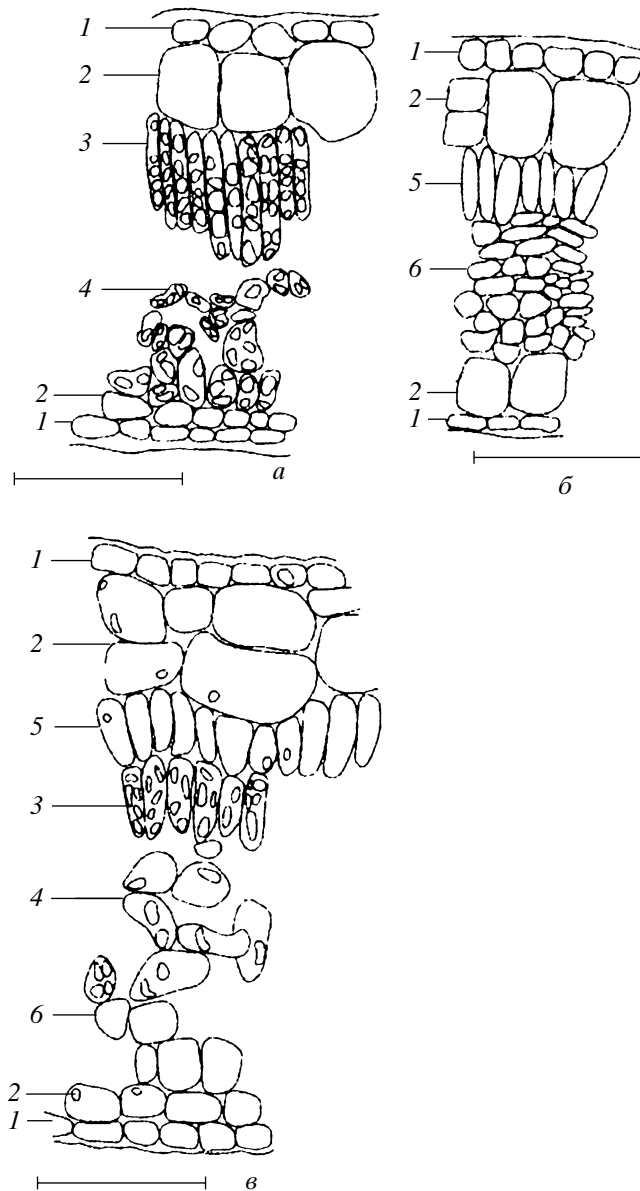


Рис. 1. Поперечные срезы листьев *Ficus benjamina*: а – цельнозеленый лист сорта Daniel; б – пестролистная химера сорта Starlight, белая зона; в – то же, переходная зона.

1 – эпидермис; 2 – субэпидермальные слои; 3–6 – мезофилл: 3 – зеленый столбчатый, 4 – зеленый губчатый, 5 – белый столбчатый, 6 – белый губчатый. Масштаб: 100 мкм.

дермальным слоям. Фотосинтезирующая ткань листа с адаксиальной стороны имеет один слой столбчатого мезофилла, а глубже – губчатого мезофилла.

Анатомическое строение листа сорта Starlight представлено на рис. 1, б–в, из которого видно, что строение эпидермиса листа у химеры не имеет принципиальных отличий от сорта Daniel. Вме-

сте с тем субэпидермальные клетки с нижней стороны листа меньше, чем у сорта Daniel, и по размеру приближаются к эпидермальным. Кроме того, в некоторых местах видны периклинально делящиеся клетки субэпидермального слоя, образующие дополнительный внутренний слой. Периклинальные деления не приурочены к определенным участкам. Таким образом, число субэпидермальных слоев у сорта Starlight варьирует. В субэпидермальном слое как в белой, так и в зеленой зонах листа химеры различимы пластиды. При возбуждении флуоресценции зеленым светом ($\lambda = 543$ нм) в этом слое наблюдали красное свечение хлорофилла, что указывает на присутствие в субэпидермальном слое хлоропластов, хотя их число невелико по сравнению с мезофиллом. В химерном листе мезофилл в белой и зеленой зонах имеет строение, аналогичное таковому сорта Daniel. Он представлен одним слоем столбчатого мезофилла и нижележащими клетками губчатого мезофилла.

В листьях *F. benjamina* Starlight кроме зеленой зоны в центре и белой – по краям можно наблюдать переходную зону бледно-зеленой окраски, расположенную между ними. Переходная зона в листе варьирует по окраске от светло-зеленой к темно-зеленой, приближаясь по цвету к зеленой зоне. В самых светлых участках переходной зоны на поперечном срезе виден один слой столбчатого белого мезофилла с адаксиальной стороны, а далее белый губчатый мезофилл. В последнем чередуются слои белых, зеленых и вновь белых клеток (см. рис. 1, в). В более зеленой переходной зоне с адаксиальной стороны по-прежнему находится один слой белого столбчатого мезофилла, за ним – еще один слой столбчатого зеленого мезофилла. С абаксиальной стороны расположен губчатый зеленый мезофилл, а таковой белый отсутствует. В наиболее зеленой переходной зоне виден только один слой столбчатого мезофилла, он состоит из белых и зеленых клеток, причем зеленые клетки идут следом за белыми, вклиниваясь в их ряд (рис. 1, в).

На срезе переходной зоны с абаксиальной стороны помимо эпидермиса и субэпидермального слоя с периклинально делящимися клетками виден еще один, внутренний, слой клеток. Это может быть субэпидермальный слой, однако, судя по форме и неупорядоченному расположению клеток, можно предположить, что это губчатый белый мезофилл, вклинившийся в переходную зону поверх зеленого губчатого мезофилла.

Строение млечников и проводящей системы у листьев химеры и у зеленого сорта не различались. Следует отметить, что у *F. benjamina* Starlight жилки листа идут непрерывно из белой в переходную и далее – в зеленую зону, что говорит о

Содержание пигментов в зонах листа *F. benjamina* сорта Starlight и в листьях *F. benjamina* сорта Daniel (данные из 10 биологических повторностей)

Объект	Хлорофилл <i>a</i>		Хлорофилл <i>b</i>		Каротиноиды		Отношение	
	мкг/см ²	%	мкг/см ²	%	мкг/см ²	%	<i>a/b</i>	каротиноиды/(<i>a + b</i>)
Сорт Daniel	20.49 ± 0.19	100	7.23 ± 0.08	100	3.17 ± 0.04	100	2.83	0.11
Сорт Starlight (зеленая зона)	12.30 ± 0.21	60.0	4.16 ± 0.05	57.5	2.38 ± 0.04	75.1	2.96	0.14
Сорт Starlight (белая зона)	1.36 ± 0.02	6.6	0.79 ± 0.02	4.9	0.65 ± 0.01	20.5	1.71	0.30

согласованном развитии проводящей системы в генетически разнородных клетках.

Анализ пигментов в белой зоне методами спектрофотометрии и ВЭЖХ позволил выявить наличие всех групп фотосинтетических пигментов, однако их содержание было значительно снижено по сравнению с зеленой зоной листа (таблица). С помощью ВЭЖХ было показано отсутствие продуктов деградации хлорофиллов в белой зоне, значит, фотодеградации пигментов в процессе развития листа не происходит. Наличие зеленых пластид в белой зоне дополнительно подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии. Интересно, что на ранних стадиях будущие белые клетки неотличимы от таковых зеленых, позднее край листа становится светло-зеленым и лишь в зеленом листе приобретает типичную белую окраску. Можно предположить, что по мере развития листа в белой зоне падает число пластид на единицу объема ткани. Таким образом, белый фенотип у *F. benjamina* Starlight объясняется скорее низким числом хлоропластов в клетках, чем повреждением в цепи биосинтеза хлорофилла или фотодеструкции.

Анатомическое строение апикальной меристемы побега F. benjamina сорта Starlight. Изучение организации меристемы у сорта Starlight показало, что к данному химерному объекту вполне применимы классические представления о том, что апикальная меристема побега цветковых растений состоит из туники и корпуса (Schmidt, 1924 – цит. по: Эсау, 1969). На продольных срезах меристемы можно выделить слои клеток, делящихся антиклинально (туника), и клетки корпуса, делящиеся в разных направлениях (рис. 2). Хотя число слоев туники у покрытосеменных может варьировать от 0 до 6 (Romberger, 1963) и иногда изменяется в зависимости от объема меристемы (Тимонин, 1984), у *F. benjamina* сорта Starlight меристема состоит из трех слоев клеток (L1, L2, L3). На стадии закладки примордия граница между туникой и корпусом практически незаметна в связи с глобальной переориентацией направлений клеточных делений, но на срезах в дистальной части развивающегося примордия различимы два слоя

клеток, делящихся внутрь периклинально. Однако в проксимальной части примордия определить число входящих в него слоев невозможно, поэтому мы не можем сказать, два или три слоя туники участвуют в закладке листа. Поскольку на стадии активных делений невозможно различить клетки, которые впоследствии станут белыми и зелеными, мы не можем прямо подтвердить гипотезу о том, что мутантные клетки сосредоточены только в слое L1 и L2.

Зависимость доли белой зоны в листе F. benjamina сорта Starlight 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 соотношение белой и зеленой зон у листьев, расположенных на ветвях разного порядка. В ходе анализа выяснилось, что сорт Starlight обладает большой способностью к ветвлению. Так, на 7-летнем растении можно найти ветви 4-го порядка, а ветви 2-го и 3-го порядков встречаются довольно часто (на ветвях 4-го порядка находится 2% листьев, ветви 2-го и 3-го порядков несут соответственно 42 и 19% всех листьев).

При оценке соотношения зеленой и белой зон все листья были разделены на пять групп (рис. 3): 95–100% зеленой зоны – I, 75–95% – II, 50–75% – III, 25–50% – IV и 0–25% – V. Размер проанализированной выборки – 249 листьев.

Для каждого из порядков ветвления существуют преобладающие в них группы листьев. Так, для главного побега (0-го порядка) наиболее характерны почти полностью зеленые листья. Для ветвей 1-го порядка это группа II; на ветвях 2-го порядка преобладают листья, у которых зеленая зона занимает от 1/4 до 3/4 листа. На ветвях 3-го порядка больше всего самых белых листьев – V группа. Зависимость между долей белой зоны в листе и порядком ветви, на которой он находится, представлена на рис. 4. Для сравнения провели подобные измерения на 1-летних растениях, полученных черенкованием 7-летнего *F. benjamina* Starlight. Степень ветвления у этих растений ниже – встречаются ветви 0, 1 и 2-го порядков. Преобладают листья групп III и IV (50–75 и 25–50% зеленой зоны), что

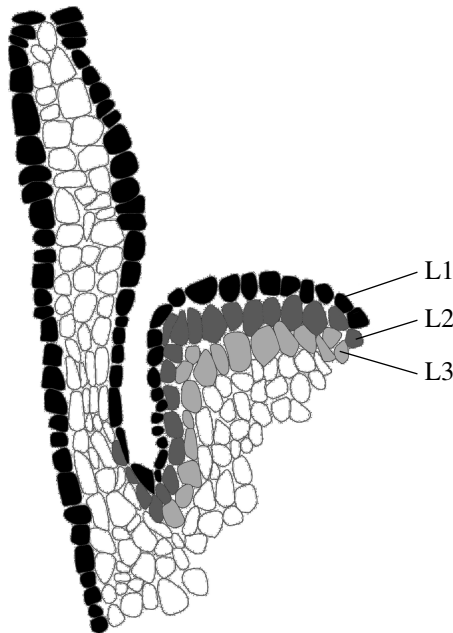
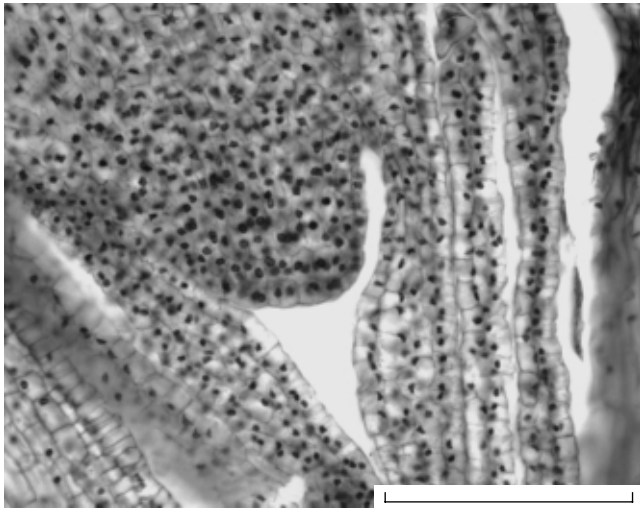


Рис. 2. Поперечный срез апикальной меристемы побега пестролистной химеры *Ficus benjamina* сорта Starlight. Внизу показаны слои туники апикальной меристемы (L1–3). Масштаб: 500 мкм.

характерно и для 7-летнего *F. benjamina* сорта Starlight. Однако по сравнению с 7-летним растением заметно уменьшение доли листьев группы I (с наибольшей зеленой зоной) иногда до 0% и возрастание доли самой белой группы листьев V. В распределении групп листьев по ветвям разных порядков можно отметить сдвиг на один порядок: распределение по сравнению с 7-летним Starlight для 1-го порядка схоже со 2-м, а 2-го – с 3-м порядком. Это можно объяснить меньшим числом порядков ветвления в молодых растениях и, соответственно, их возрастом, а также тем, что главные оси молодых растений были осями 1-го порядка до черенкования.

Таким образом, при исследовании растений разного возраста мы показали, что доля белой зоны в листе зависит от порядка ветви, на которой он находится: чем больше порядок, тем больше и доля. Вероятно, в случае ветвей разных порядков роль листьев как доноров фотоассимилятов разная, т.е. они испытывают разную ассимиляционную нагрузку. Кроме того, листья, находящиеся ближе к главной оси, лучше снабжаются водой и минеральными солями, а отток фотоассимилятов у них может идти быстрее. Все эти факторы, вероятно, оказывают влияние на соотношение зеленой и белой зон в листе.

Интересно отметить, что длина междоузлий у химерного сорта Starlight (среднее значение – 1.7 см) оказалась достоверно меньше ($\alpha = 0.95$), чем у контрольного сорта Daniel (среднее значение – 2.0 см). Возможно, это связано с меньшим числом пластид в пестролистном растении из-за наличия белой ткани в листьях, поскольку известно, что в пластидах происходят начальные стадии биосинтеза гиббереллинов, которые могут влиять на длину междоузлий (Olszewski et al., 2002).

Зависимость площади листа от соотношения зеленой и белой зон. У сорта Starlight выявили положительную корреляцию между долей зеленой зоны и площадью листа. Так, например, у группы I (наиболее зеленые листья) средняя площадь листа составила 50 ± 0.5 , а у группы V (почти белые листья) – 23 ± 0.2 см². Поскольку листья разных групп представлены неравномерно на осях разных порядков, площадь листа могла зависеть от его положения. Измерения площади листьев на осях разного порядка у сорта Daniel показали, что площадь листа не зависит от порядка оси и составляет 46 ± 0.2 см².

При сканировании одного и того же химерного листа после развертывания из почки до полного его развития было показано, что доля зеленой и белой зон мало меняется по мере его роста. Очевидно, у *F. benjamina* сорта Starlight в процессе развития листа соотношение фотоассимилирующих (зеленых) и акцепторных (белых) клеток определяется достаточно рано (возможно, уже при закладке примордиев) и в дальнейшем остается неизменным.

Влияние суммарной площади ассимилирующей поверхности на долю белой зоны в образующихся на побегах листьях. Для выявления зависимости доли зеленой зоны от уже имеющейся ассимилирующей площади, т.е. от суммарной площади зеленых зон всех листьев, которые были на побеге в момент закладки данного листа, провели эксперимент с удалением боковых побегов. Анализ изображений листьев экспериментальных побегов показал, что при увеличении суммарной зеленой поверхности побега новые листья имеют меньшую долю зеленой зоны (рис. 5). Следует отметить, что площадь листьев при этом существенно не менялась.

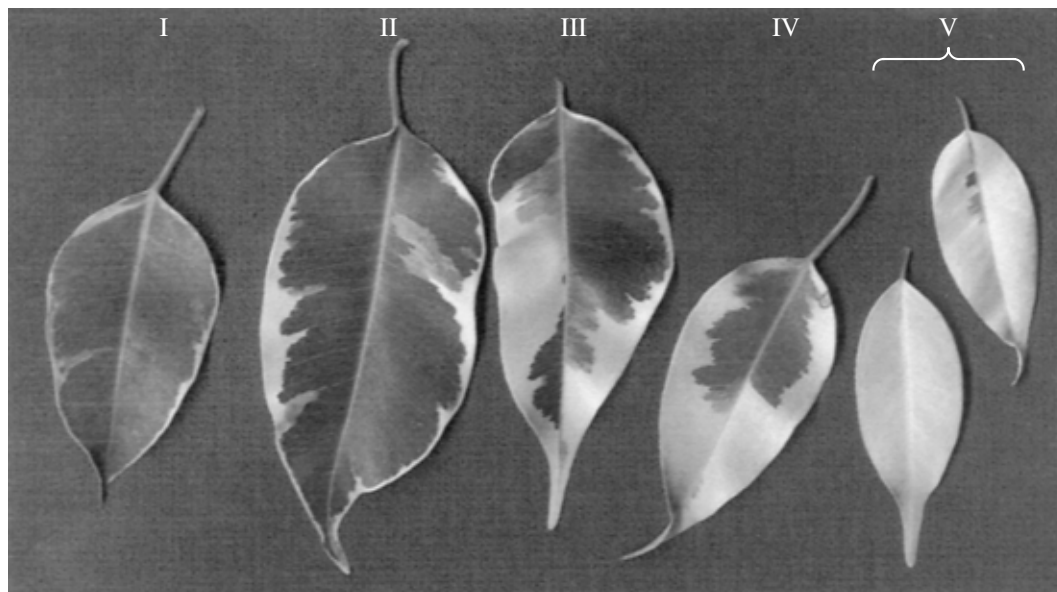


Рис. 3. Пять групп листьев *F. benjamina* сорта Starlight.

Таким образом, видно, что доля нефотосинтезирующей зоны в новом листе пропорциональна уже имеющейся таковой зеленой. Такая же закономерность выявлена при использовании более простой модели: изолированные побеги одного порядка переносили в водную культуру и удаляли у них все боковые почки, чтобы предотвратить отток ассимилятов в боковые ветви. При накоплении суммарной площади зеленой зоны в нижележащих листьях доля белой зоны в новых листьях возрастала (рис. 4). Этот рост имел колебательный характер, что можно объяснить некоординированностью поступления сигнала и ответных ростовых процессов – в ответ на каждое последующее увеличение доли белой зоны происходило “выравнивание” доли зеленой зоны. Таким образом, можно предположить, что метаболический сигнал от фотосинтезирующих листьев оказывает воздействие на ростовые процессы в листьях, появляющихся на побеге, и изменяет соотношение зеленой и белой зон.

ОБСУЖДЕНИЕ

В формировании листа двудольных обычно участвуют все три слоя туники: наружный L1 отвечает за образование однослойного эпидермиса, лежащие под ним L2 и L3 участвуют в формировании остальных тканей листа. Система жилок образуется в основном путем дифференциации паренхимных клеток, происхождение которых может быть различно или является производными L2 либо L3. Край листовой пластинки часто формируется из слоя L2, а центральная часть – из L3 (Dermen, 1947).

Казалось бы, если лист следует жестко детерминированной программе развития, рисунок у листьев химер должен быть постоянным. Тем не менее изменение рисунка, а также расположения слоев мутантных и зеленых тканей наблюдается достаточно часто. Так, у *F. benjamina* сорта Starlight образуются как зеленые листья с узкой каймой по краю, так и почти белые со всеми переходными формами (рис. 2). Изменчивость анатомического строения растительных химер отмечена достаточно давно (Джонс, 1936). Например, у *Pelargonium zonale* в листе показано смещение белых клеток из нижнего субэпидермального слоя в середину мезофилла листа. Для объяснения этого явления была выдвинута гипотеза о случайном смещении инициалей соответствующих слоев клеток, происходящем в меристеме побега (Джонс, 1936).

Тем не менее стабильность в относительном расположении белой и зеленой зон химеры может быть достаточным основанием, чтобы утверждать неизменность в распределении мутантных и зеленых клеток в слоях меристемы (Джонс, 1936; Кренке, 1947).

Однако в последнее время накоплено немало данных о том, что судьба меристематических клеток не жестко детерминирована при развитии листа (Тимонин, 1984; Poethig, 1987). Так, Дюлье, используя метод клонального анализа, показал, что лист *Nicotiana tabacum* возникает из ограниченной группы клеток, принадлежащих нескольким слоям меристемы, а варибельность судьбы клеток меристемы зависит больше от морфологических и физиологических факторов, чем от наследственного морфогенного потенциала отдельных клеток (Dulieu, 1969 – цит. по: Poethig, 1987).

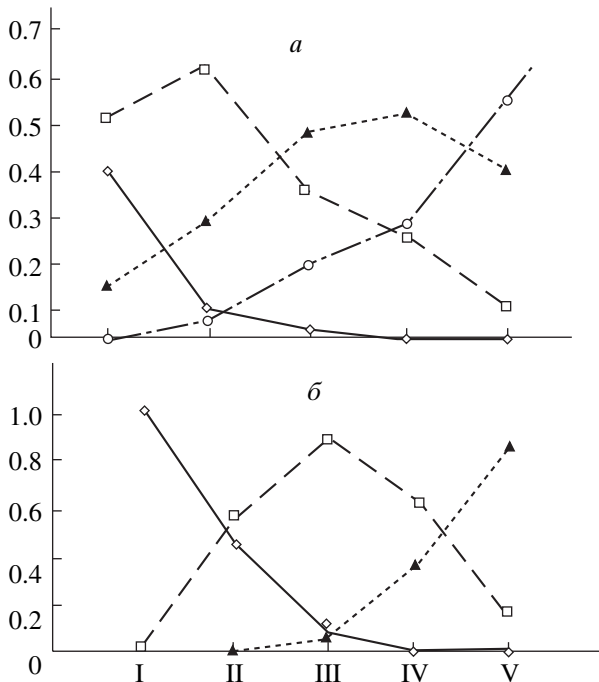


Рис. 4. Зависимость степени развития белой зоны в листе от порядка ветви, на которой расположен лист: *а* – 7-летний *F. benjamina*, сорт Starlight; *б* – молодой (1-летний) *F. benjamina*, сорт Starlight.

Размер выборки: *а* – 249, *б* – 115 листьев; погрешность измерений – 1 лист.

По оси абсцисс – I–V – группы; по оси ординат – доля листьев разных порядков в группах, %. Порядки: (◇) – нулевой, (□) – первый, (▲) – второй, (○) – третий.

Тимонин (1984) на листьях *Amaranthus retroflexus* L. показал, что в построении субэпидермального слоя могут участвовать производные корпуса. Вариативность развития листа, вероятно, также связана с разной скоростью делений генотипически различных клеток (Dulieu, 1967; Pohlheim, 1973, 1983 – цит. по: Poethig, 1987).

Мезофилл в норме образуется из слоя L2 или еще более глубоких слоев клеток (Эсау, 1964; Тимонин, 1984), однако в некоторых случаях клетки внешнего слоя туники L1, которые обычно формируют эпидермис, могут образовывать мезофилл, если топографически оказываются в соответствующем участке примордия (Stewart, Burk, 1970). Существуют разные механизмы формирования покровных тканей. Многослойный эпидермис *F. rubiginosa* сорта *Variegata* образуется путем периклинальных делений клеток L1 (Beardsell, Norden, 2004), тогда как гиподермальные клетки у *Lophostemon confertus* формируются из слоя L2 (Bergann F., Bergann L., 1983 – цит. по: Beardsell, Norden, 2004).

Сама структура мезофилла может заметно меняться в зависимости от условий освещения. Так, у *Ficus benjamina* количество слоев мезофилла ва-

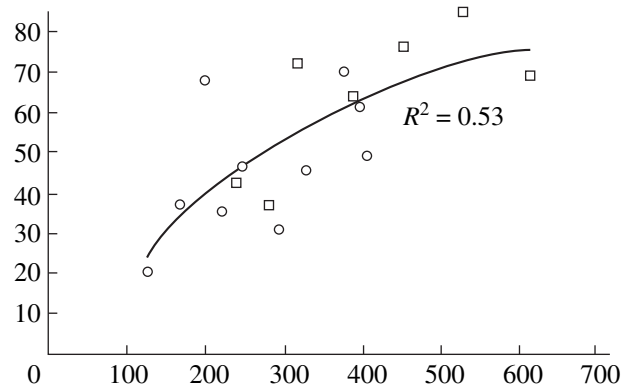


Рис. 5. Зависимость доли белой зоны в новом листе (по оси ординат, %) от суммарной площади зеленой зоны (по оси абсцисс, см²) в уже имеющихся листьях на побеге.

рирует: световые листья имеют два слоя палисадного мезофилла, тогда как теневые только один (Peterson, 1986 – цит. по: Steincamp et al., 1991). Анатомическое строение листа пестролистной химеры *F. benjamina* сорта Starlight заметно отличается: в ее листе встречается два слоя столбчатого мезофилла, особенно это характерно для переходной зоны (рис. 1, в). Имеются различия и в числе субэпидермальных слоев: для химерного сорта характерно наличие двух или трех, тогда как в листьях зеленого растения мы наблюдали лишь один субэпидермальный слой. Это указывает на большую вариативность в строении листа химеры по сравнению с нормальным растением. Анализ распределения мутантной и зеленой тканей в переходной зоне позволяет предположить, что генотипически различные клетки при развитии листа ведут себя несогласованно. При получении одного и того же индукционного сигнала они независимо образуют слой палисадной паренхимы, что приводит к необычному двухслойному мезофиллу, состоящему из белых и зеленых клеток (рис. 1, в). В результате суммарная толщина листа в переходной зоне химеры часто оказывается большей, чем в чисто-белых или в чисто-зеленых участках.

Строго согласованное развитие у генетически однородного листа в этих же условиях приводит к формированию лишь одного слоя мезофилла. Это подтверждается анатомическим строением листа в зоне, где мезофилл образован только зелеными (рис. 1, а) или только белыми (рис. 1, б) клетками.

Можно выделить различные экзогенные факторы, способные повлиять на пропорции участия L1, L2 и других слоев в формировании листа. Для *Nicotiana sylvestris* было показано влияние механического стресса (Marcotrigiano, 2000). Морфогенные свойства слоя белых клеток зависят также от конкретного генотипа, из чего следует, что ис-

пользование химер для анализа закладки и развития органов не всегда корректно (Marcotrigiano, Morgan, 1988). В случае бело-зеленой пестролистной химеры *F. benjamina* сорта Starlight мы предполагаем, что доля фотоассимилирующей поверхности является одним из факторов, оказывающих влияние на пролиферативную активность генетически различных слоев при формировании листа (рис. 3).

У *Ficus rubiginosa* сорта Variegata – периклиальной химеры с сезонно появляющимися пятнами зеленого мезофилла – имеется четыре эпидермальных слоя с обеих сторон листа (Beardsell, Norden, 2004). Авторы работы предполагают, что островки зеленого мезофилла образуются из слоя L1. Интересно, что эти островки всегда контактировали с проводящей системой, поэтому было высказано предположение, что проводящая система *F. rubiginosa* сорта Variegata также возникает из слоя L1 (Beardsell, Norden, 2004). На наш взгляд, такая интерпретация недостаточно реалистична. Мы можем дать альтернативное объяснение: положение зеленого мезофилла определяется локальными донорно-акцепторными отношениями между тканями в листе. Из зеленой ткани фотоассимиляты необходимо поставлять в другие части растения, поэтому жилки листа служат источником позиционной информации, на которую реагирует слой L1. Именно в месте прохождения жилок внешний слой разрастается, образуя зеленые клетки мезофилла, что приводит к тесному контакту зеленых клеток с элементами проводящей системы.

В нашей системе с *F. benjamina* сорта Starlight регуляторным механизмом может служить общая продукция сахаров. При развитии фотоассимилирующей поверхности (листья группы I) в развивающиеся примордии листьев поступает больше сахаров, площадь зеленой зоны уменьшается (образуются листья групп II–IV). На самых молодых побегах высокого порядка в начале развития листовой серии из-за обилия фотоассимилятов могут закладываться совершенно белые листья или листья из группы V с низкой долей зеленой ткани (рис. 2, 3). Эта гипотеза подтверждается данными эксперимента, где все листья были образованы одной меристемой и не происходил отток сахаров в боковые побеги. Чем больше фотосинтетически активная площадь, тем больше белой ткани развивается в примордиях листьев. Вероятно, существует оптимальное для данных условий выражения соотношение между площадями белой и зеленой зон. Если доля белой зоны превышает эту величину, ощущается недостаток сахаров и новые примордии вынуждены образовывать больше зеленого мезофилла.

Дефицит продуктов фотосинтеза наблюдается и при черенковании: отделенный от маточного

растения побег высокого порядка несет в среднем листья с малой долей зеленого мезофилла. Молодое растение сначала должно восстановить фотосинтетический аппарат и образовать листья групп I, II, а в дальнейшем – менее зеленые листья (рис. 3).

На рост химерного растения оказывают влияние и более тонкие регуляторные механизмы. Например, начальные стадии биосинтеза гиббереллинов идут в пластидах (Olszewski et al., 2002), т.е. состояние пластид влияет на уровень гиббереллинов, что отражается на общей высоте растения и длине междоузлий. Химерные растения, действительно, растут менее интенсивно, а средняя длина их междоузлий составляет 85% от зеленого растения. По предварительным данным, у *F. benjamina* сорта Starlight снижено апикальное доминирование, усилено развитие боковых побегов, медленнее происходит укоренение. Вероятно, у химеры снижен уровень эндогенного ауксина. Таким образом, у пестролистных химер не только изменяются отношения между ассимилирующими и гетеротрофными тканями, но также изменяется гормональный статус.

В заключение отметим, что каждое химерное растение является уникальным объектом с высокой вариабельностью судьбы меристематических клеток и возможностями регуляции развития листа различными факторами. Мы считаем, что пестролистная химера, имеющая в листе как фотосинтезирующую, так и нефотосинтезирующую ткани, регулирует соотношение тканей-доноров и тканей-акцепторов сахаров в процессе развития каждого листа отдельно в зависимости от трофической обстановки, которая в данный момент наблюдается в растении.

Авторы выражают благодарность А.К. Тимонину за помощь в работе с литературой и ценные консультации; В.Б. Иванову – за любезное предоставление редкой литературы, внимательное прочтение рукописи, небезразличное отношение к проводимой работе; Е.В. Ключикову – за помощь в постановке вегетационных опытов; С.В. Купцову – за плодотворное обсуждение результатов и дружеское участие; К.А. Астафьеву – за содействие при приготовлении срезов и помощь при интерпретации результатов; Л.И. Лотовой – за методические консультации; М.Н. Мерзляку – за любезное предоставление микроскопа и большое содействие в эксперименте; А.Е. Соловченко – за помощь в фотографировании срезов и ценные практические советы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Деватов А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Справочное руководство. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.

- Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу / Под ред. Ермакова И.П. М.: Издат. центр "Академия", 2003. 256 с.
- Джонс У.Н. Растительные химеры и прививочные гибриды. М.; Л.: Гос. изд-во биол. и мед. лит-ры, 1936. 132 с.
- Кренке Н.П. Химеры растений. М.: Изд-во АН СССР, 1947. 373 с.
- Мокроносов А.Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. М.: Наука, 1983. 64 с.
- Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. М.: Высш. шк., 1960. 208 с.
- Тимонин А.К. Анатомия вегетативных листьев некоторых видов *Amaranthus* L. 1. Развитие // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1984. Т. 89. Вып. 2. С. 82–88.
- Шимои Х., Токуда Г., Танака И. и др. Простой метод анализа двумерных цветных изображений листьев растений // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 1. С. 139–147.
- Эсау К. Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 554 с.
- Beardsell D., Norden U. *Ficus rubiginosa* "Variegata", a chlorophyll-deficient chimera with mosaic patterns created by cell divisions from the outer meristematic layer // Ann. Bot. 2004. V. 94. P. 51–58.
- Dermen H. Periclinal cytochimeras and histogenesis in Cranberry // Amer. J. Bot. 1947. V. 34. № 1. P. 32–43.
- Lichtenthaler K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrans // Meth. Enzym. 1987. V. 148. P. 351–382.
- Marcotrigiano M. Herbivory could unlock mutations sequestered in stratified shoot apices of genetic mosaics // Am. J. Bot. 2000. V. 87. P. 355–361.
- Marcotrigiano M., Morgan P.A. Chlorophyll-deficient cell lines which are genetically uncharacterized can be inappropriate for use as phenotypic markers in developmental studies // Ibid. 1988. V. 75. P. 985–989.
- Olszewski N., Sun T., Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 61–80.
- Pintea A., Bele C., Andrei S., Socaciu C. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers // Acta Biol. Szegediensis. 2003. V. 47. P. 37–40.
- Poethig R.S. Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development // Amer. J. Bot. 1987. V. 74. P. 581–594.
- Romberger J.A. Meristems, growth and development in woody plants. An analytical review of anatomical, physiological and morphogenic aspects // Tech. Bull. U.S. Dept. Agriculture, Forest Service. 1963. № 1293. 256 p.
- Steincamp K., Conover C.A., Poole R.T. Acclimatization of *Ficus benjamina*: a review // Central Florida Research and Education Center (CFREC-A). Apopka research index. 1991. http://mrec.ifas.ufl.edu/Foliage/Resrpts/rh_91_5.htm
- Stewart R.N., Burk L.G. Independence of tissues derived from apical layers in ontogeny of the tobacco leaf and ovary // Amer. J. Bot. 1970. V. 57. P. 1010–1016.
- Stewart R. N., Dermen H. Ontogeny in monocotyledons as revealed by studies of the developmental anatomy of periclinal chloroplast chimeras // Ibid. 1979. V. 66. P. 47–58.
- Szymkowiak E.J., Sussex I.M. What chimeras can tell us about plant development // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 351–376.
- Tilney-Basset R. Plant chimeras. L.: Edward Arnold Publ. Ltd., 1986. 103 p.

Leaf Anatomy of the Mosaic *Ficus benjamina* cv. Starlight and Interaction of Source and Sink Chimera Components

© 2007 г. Е. А. Labunskaya, Т. V. Zhigalova, and V. V. Choob

Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119992 Russia

E-mail: styx_elenalab@mail.ru

Received June 9, 2006; in final form, January 25, 2007

Abstract—Leaf anatomy was studied in the mosaic *Ficus benjamina* cv. Starlight and non-chimeric *Ficus benjamina* cv. Daniel. The number of chloroplasts in a white, chlorophyll-deficient tissue declines as compared to the green tissue. However, their functional activity is retained. The leaf of the mosaic *F. benjamina* contains two or, sometimes, three subepidermal layers. Mesophyll forms one layer in the green and white parts of leaf palisade and one white and one green layer in the transitional zone (edge). In the transitional zone, green spongy mesophyll is located between two white spongy layers and the proportion of photosynthesizing cells varies. In cv. Daniel, there are two subepidermal layers and one layer of columnar mesophyll cells. According to the morphometry data, the proportion of white zone in the leaf correlates with the leaf position in the whole shoot: the higher the branch order, the larger the proportion of white zone. The total leaf area depends also on its position in the shoot. No such correlation was found in non-chimeric *F. benjamina* cv. Daniel. In the mosaic chimera, the source-sink status appears to depend on the leaf position in the shoot. Experiments with individual shoots of the same order and elimination of all lateral shoots have shown that the proportion of white zone in new leaves on the shoot increases with the total area of green zone. Thus, the area of assimilating shoot surface affects the formation of leaves in the meristem. A hypothesis was put forward that the source-sink state affects the ratio of green and white parts in the leaf primordium. Products of photosynthesis (carbohydrates) are a possible metabolic signal affecting the meristem. It cannot be excluded as well that the hormonal state undergoes changes in the chimeric plant.

Key words: chimeras, mosaicism, leaf development, leaf anatomy, *Ficus benjamina*, source-sink interactions.