

УДК 581.1

ФОРМИРОВАНИЕ ПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ СОЗРЕВАЮЩИХ ПЛОДОВ ФАСОЛИ (*Phaseolus limensis* L.) ПО ДАННЫМ ЯДЕРНОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ МИКРОТОМОГРАФИИ

© 2012 г. И. С. Виноградова¹, О. В. Фалалеев²

¹ Сибирский государственный технологический университет, 660049
Красноярск, проспект Мира, 82
E-mail: vis@akadem.ru

² Институт физики им. Л.В. Киренского, Красноярский научный центр СО РАН, 660036 Красноярск,
Академгородок-50, стр. 38
E-mail: falaleev_ov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.10 г.
Окончательный вариант получен 02.05.11 г.

Метод ¹H магнитно-резонансной микротомографии применен для изучения проводящих систем плодов фасоли *Phaseolus limensis* в процессе их формирования. Используя методику градиентного эха получены 2D томографические срезы в сагиттальной и аксиальной плоскостях на плодах, снятых с вегетирующего растения через 10, 17, 24 и 31 день после появления завязи. Не обнаружено сосудистой связи между материнскими тканями растения (створки боба и кожура семени) и зародышем. Зародыш имеет автономную, разветвленную сетку прокамбиальных тяжей в семядолях, стягивающихся к зародышевой оси. Створки плода покрыты сеткой проводящих пучков, крупные сосудистые тяжи проходят вдоль спинного и брюшного швов. Проводящие пучки кожуры формируются в процессе роста семени, и в стадии физиологической зрелости они представлены обширной сосудистой системой, разветвляющейся многократно в средней части основной паренхимы. С источником ассимилятов они связаны через латеральные жилки стручка и крупный проводящий пучок, входящий через плаценту в семя ниже рубчика. Через проводящие пучки фуникулуса и ткань рубчика ассимиляты поступают на внешнюю часть семенной кожуры, которая не содержит проводящих пучков.

Ключевые слова: ¹H магнитно-резонансная микротомография, плоды лимской фасоли (*Phaseolus limensis*), рост и формирование семян, проводящие пучки, транспорт ассимилятов.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается активное внедрение методов ядерной магнитно-резонансной томографии (МРТ), исключительно глубоко развитой в медицине (Ринки, 2003), в практику биохимикофизических исследований (Callaghan, 1991; Коптюг, Сагдеев, 2002) в виде нового, формирующегося направления — ЯМР микротомографии, главным образом, по ядрам ¹H. Метод непрерывно развивается и совершенствуется и в настоящее время применяется широко к исследованию растений. Микроскоп ЯМР обнаруживает свободную воду в тканях и создает анатомические томограммы тканей без их разрушения.

Приложение метода к исследованию растений можно найти в обзорах: (Chudek and Hunter, 1997; Ishida et al., 2000; Scheenen et al., 2000; Köckenberger, 2001; Ciobanu et al., 2003; Köckenberger et al., 2004; Scheenen et al., 2007; Van As et al., 2009). Методом МРТ изучалась динамика набухания на семенах сои (Pietrzak et al., 2002), фасоли (Kikuchi

et al., 2006), люпина (Garnczarska et al., 2007), табака (Manz et al., 2005), риса (Akemi et al., 2006) и др. В результате этих исследований были найдены участки, через которые вода поступает в набухающие семена, и изучено ее пространственное распределение, которое оказалось неоднородным. На семенах риса (Ishida et al., 2004), ячменя (Glidewell, 2006) и гороха (Garnczarska et al. 2008) изучены процессы естественной сушки при созревании семян.

Одной из важных задач физиологии растений является изучение потоков питательных веществ, которые осуществляются через проводящие пучки. В решении этой задачи метод МРТ также внес свой вклад. На плодах земляники (Goodman et al., 1992), малины (Williamson et al., 1994), яблок (MacFall and Johnson, 1994), винограда (Glidewell et al., 1997) и др. изучалась архитектура проводящих пучков. В результате дальнейшего развития метода МРТ появились методики, позволяющие дифференцировать ткани проводящих пучков и

изучать потоки растворов питательных веществ через них (Köckenberger et al., 1997; Verscht et al., 1998; Scheenen et al., 2000). В этих исследованиях на томограммах, полученных от стеблей растений или гипокотилей проростков, удалось дифференцировать ксилему и флоэму, вычислить в естественных условиях скорости и расходы потоков воды через них и показать, что имеет место внутреннее обращение воды между флоэмой и ксилемой. Следует отметить, что в стеблях проводящая система сравнительно простая и представлена параллельными сосудистыми пучками, расположенными концентрически вокруг центральной части стебля. Пучки достаточно крупные, например, в стебле огурца диаметр ксилемы 0.35 мм. Их архитектура и внутреннее строение хорошо изучены с помощью световой микроскопии. Однако, очень мало известно о проводящей системе семян растений, а те сведения, которые имеются, получены в основном с помощью световой микроскопии на тонких срезах.

Изучая методом МРТ процессы поступления воды в воздушно-сухие семена лимской фасоли (*Phaseolus limensis* L.) при их контакте с водой (Виноградова и Фалалеев 2010а) мы обнаружили, что после прохождения первой стадии набухания на томограммах внутри семядолей появляются водонасыщенные структуры. Анализ литературных данных (Цингер, 1958), в том числе микротомографических (Garczarska et al., 2008), показал, что обнаруженные нами структуры относятся к проводящим пучкам. Проведенные далее исследования на выращенных нами плодах лимской фасоли (*Phaseolus limensis*) в стадии физиологической зрелости (Виноградова и Фалалеев, 2010б) показали, что на томограммах четко фиксируются отдельные ткани плодов и семян, а также проводящие пучки. Проводя последовательные томографические срезы на плодах фасоли, мы получили картины проводящих пучков разной архитектуры в створках и швах плода, в семенной кожуре, семядолях и зародышевой оси. По результатам этих исследований была поставлена задача с помощью метода МРТ изучить плоды фасоли на разных стадиях их созревания, проследить за формированием отдельных тканей и сосудистой системы, что и явилось целью настоящего исследования. Представляло также интерес сравнить результаты, полученные с помощью двух микроскопов: МРТ и светового.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Растительные образцы. Растения лимской фасоли выращивались в теплице из семян, поставляемых ООО “Мистраль Трейдинг”. Они быстро росли вверх, достигая высоты более 2-х метров. Цветonoсы многоцветковые, но практически все цветы опадали без завязи. И лишь на некоторых в

августе появились первые завязи. Дата появления завязей фиксировалась, и от нее отсчитывалось время созревания плодов. Первые эксперименты проводились на плодах, снятых через 10 дней после отмеченного срока, далее плоды снимались через каждую неделю. Всего было изучено 4 партии плодов (с трехкратным повтором), отличающихся сроками созревания: на 10, 17, 24 и 31 день после появления завязей. При записи томограмм семена оставались внутри плода, прикрепленные семяножками к его брюшному шву.

Метод МРТ. Метод ЯМР-микротомографии появился в середине 1980-х годов. Он характеризуется относительно невысоким пространственным разрешением порядка десятков и сотен микрометров, что определяется относительно низкой чувствительностью и спектральной шириной сигнала ЯМР, которая значительна в случае твердых тел. Неоспоримым достоинством является возможность исследовать внутреннюю структуру и свойства объектов, в том числе и оптически непрозрачных, без их разрушения, что особенно важно в медицине и биологии. Другим достоинством метода является возможность получать информацию вдоль любого направления. Подавляющая часть исследований выполняется с использованием сигналов ЯМР ^1H . Получение изображения методом МРТ – мощное средство исследования воды в живых системах. Описание метода МРТ можно найти в монографиях (Farrar and Becker, 1971; Morris, 1986; Pfeffer and Gerasimowicz, 1989; Callaghan P.T., 1991; Hausser and Kalbitzer, 1991; Blümich and Kuhn, 1992).

В ЯМР резонансная частота сигнала (например, протонов воды) обычно прямо пропорциональна величине приложенного к образцу внешнего магнитного поля, которое в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения делают максимально однородным. Если же исследуемый образец поместить в неоднородное поле, которое изменяется линейно вдоль выбранного направления в пространстве, то есть если создать градиент поля, как это предложил Лаутербур (Lauterbur, 1973), то резонансная частота будет изменяться пропорционально координате в данном направлении. Для исследования объемного тела необходим градиент поля в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Данный метод позволяет делать как бы анатомические срезы трехмерного тела. Для этого достаточно на время возбуждения образца создать градиент внешнего поля в направлении, перпендикулярном плоскости нужного среза. В результате при заданной частоте “возбуждения” атомных ядер будут переведены в возбужденное состояние только те ядра, для которых данная частота является резонансной, т.е. те, что лежат в некотором плоском сечении тела. Метод дает возможность получать изображение всего среза, глубина и ориентация которого задается

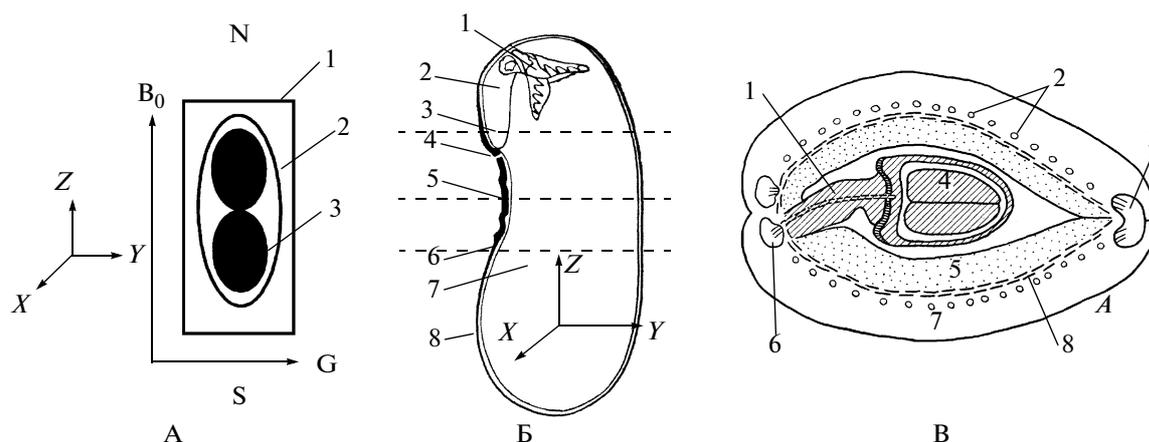


Рис. 1. А – Расположение плода лимской фасоли в радиочастотном контуре относительно статического магнитного поля B_0 , X , Y и Z – оси лабораторной системы координат. Градиент магнитного поля (G) создается вдоль оси Y . (1 – держатель образца, 2 – плод фасоли, 3 – семя фасоли); Б и В – схематическое изображение семени фасоли Б – продольный срез, 1 – почечка, 2 – гипокотиль, 3 – корешок, 4 – микропила, 5 – рубчик семени, 6 – линза (строфиолум), 7 – семядоли, 8 – семенная кожура. Пунктиром показаны плоскости поперечных томографических срезов: верхний – через корешок зародышевой оси (рис. 2Г), средний – через рубчик (рис. 2Д) и нижний – ниже рубчика в месте входа проводящего пучка в кожуру (рис. 2Е). В – поперечный срез плода на уровне семядолей зародыша. 1 – фуникулус; 2 – проводящие пучки кожуры плода; 3 – срединный плодолистиковый пучок; 4 – семядоля; 5 – внутренняя паренхима; 6 – латеральный плодолистиковый пучок; 7 – наружная паренхима; 8 – склеренхима. (Рис. В воспроизводится из работы Эсау, 1980).

оператором. Изображение строит компьютер, выполняющий двумерное преобразование Фурье. Обычно параллельно можно регистрировать до 30-ти срезов и более.

Магнитное поле создается катушкой со сверхпроводящей обмоткой при использовании в системе охлаждения жидкого азота и жидкого гелия. Возбуждение атомных ядер осуществляется с помощью катушки, питаемой радиочастотным генератором, при этом различные части образца оказываются в магнитном поле различной величины и дают сигнал ЯМР от одной пространственной координаты. Использование трех взаимно перпендикулярных градиентов поля позволяет исследовать зависимость сигнала ЯМР от двух или трех пространственных координат и тем самым получать двумерные и трехмерные изображения соответственно.

Наш томографический эксперимент проводился в Красноярском региональном центре коллективного пользования СО РАН на микротомографе фирмы “Bruker” (Германия), сконструированном из следующих элементов. Вертикальный сверхпроводящий магнит US 200/85 на 4.7 Тл, электронная стойка DPX 200, градиентная стойка GRE AT 40, датчики PH 200 WB (MINI 0.5 и MICRO 2.5) операционная система LINUX (KDE 3.5), программное обеспечение Para Vision 4.0. Максимальный размер образцов ограничен внутренним диаметром радиочастотной катушки 37 мм, диапазон стабилизируемой температуры $\pm 70^\circ\text{C}$. Томографические снимки восстанавлива-

лись с помощью матрицы 512×512 пикселей с использованием поля наблюдения (field of view) от 1.5 см для маленьких образцов до 3.0 см для больших. В данной работе использовалась методика градиентного эха (Gyngell, 1988). Период повторения импульсной последовательности (T_R) составлял от 300 до 400 мс, время эхо T_E составляло 4 мс, угол поворота намагниченности возбуждающим радиочастотным импульсом составлял 30 град.

Отдельные плоды фасоли располагались в радиочастотном контуре спектрометра так, как это показано на рисунке 1А. Семена лимской фасоли достаточно крупные и внутри плода могли находиться от одного до трех семян. Для томографического эксперимента выбирались плоды с двумя семенами, которые размещались внутри датчика вертикально. Срезы проводились для одного семени. Выбирались плоды, внутри которых семена имели примерно одинаковые размеры. Измерения проводились при комнатной температуре ($20\text{--}23^\circ\text{C}$). Томографические срезы производились в двух взаимно перпендикулярных плоскостях – сагитальной, перпендикулярной оси X и параллельной зародышевой оси (рис. 1Б), мы их в дальнейшем обозначаем как продольные, и аксиальной, перпендикулярной зародышевой оси (перпендикулярной оси Z на рис. 1Б), мы их в дальнейшем обозначаем как поперечные. Толщина срезов указана на соответствующих рисунках. Количество срезов составляло от 25 до 36. Большое количество срезов связано с тем, что сосуди-

стая система как в оболочке плода, его брюшном и спинном швах, так и в коже, семядолях и зародышевой оси семени, имеет разную архитектуру и вследствие этого картина проводящих пучков быстро меняется. Вследствие этого приходилось делать достаточно тонкие срезы, проигрывая при этом на отношении сигнал-шум, особенно на образцах ранних стадий роста. Чтобы увеличить отношение сигнал-шум, мы использовали 40-кратное накопление. Все это привело к увеличению времени записи томограмм, (4 часа), хотя одно из главных преимуществ методики градиентного эха состоит в коротком времени измерения за счет малого угла поворота намагниченности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Созревание семян фасоли происходит в течение 53–56 дней с начала цветения (Orík, 1968). Следующее за оплодотворением развитие семени обычно разделяют на три фазы (Weber et al., 2005), соответствующие X, XI и XII этапам органогенеза (Физиология...). Наши результаты получены для X и XI фаз.

Хотя в процессе МРТ-исследований выполнялось большое количество срезов для каждого образца, все их невозможно привести в рамках одной статьи, поэтому отбирались срезы, проходящие через кожуру створок плода, кожуру семени, фуникулус, зародышевую ось, семядоли, чтобы отобразить архитектуру проводящих пучков и пути поступления питательных веществ от материнского растения в растущее семя.

На рис. 2 приведены поперечные томографические срезы, под каждым снимком указано время от появления завязи; стрелками показан масштаб 5 мм. Рис. 2А; 2Б; 2В и 2Г отображают срезы в плоскости, проходящей через зародышевую ось. Чтобы показать основные пути поступления воды и питательных веществ в растущее семя, на рис. 2Д приведен срез, проходящий через середину семени, ткань рубчика и семяножку; на рис. 2Е срез проходит ниже рубчика, в месте входа крупного проводящего пучка. Места срезов показаны пунктиром на рис. 1Б. Для идентификации тканей плода мы использовали рис. 1В, взятый из книги Эзау (1980, С. 467) для фасоли.

На рисунке 2А ранняя стадия развития. В створках боба (1) четко фиксируются ткани внешней и внутренней паренхимы, разделенные сеткой проводящих пучков. Внутренняя паренхима более обширна чем внешняя, ранее дифференцированная. В спинном и брюшном швах плода расположены тяжи проводящих пучков (3). Ткани зародыша (2) дифференцированы. Выделяется зародышевая ось, семядоли и более светлая ткань вокруг семядолей, из которой впоследствии диф-

ференцируется многослойная кожа семени с проводящими пучками.

На рис. 2Б (возраст 17 дней) наиболее заметные изменения в коже семени, в которой формируется несколько слоев. Наружный тонкий слой равномерно и обильно оводнен. Внутренний на томограммах выглядит темным и в его средней части начинают формироваться проводящие пучки сначала в виде отдельных уплотнений (рис. 2Б), а затем (24 дня, рис. 2В) в виде отдельных пучков. Семя увеличивается в размерах.

В это же время дифференцируются проводящие ткани зародышевой оси, появляются прокамбиальные тяжи внутри семядолей, и более четко выделяются проводящие пучки, покрывающие створку боба (9). На рис. 2Г, Д и Е созревшее семя с проводящими пучками кожуры семени (7), створок плода (9), и заполняющими семядоли прокамбиальными тяжами (8). Для этого возраста (31 день) приведены также срезы, проходящие через фуникулус и ткань рубчика (рис. 2Д), а также срез 2Е, содержащий вход крупного проводящего пучка ниже области рубчика (11).

На рис. 3 томограммы продольных срезов: 3А–3В – первый съем плодов на 10 день после появления завязи, масштаб для них показан на 3Б. На 3Г–3И – томограммы плода, снятого через 31 день, показаны продольные срезы на разных уровнях. 3А – срез проходит через кожуру плода, проводящие пучки в створках очень тонкие и образуют едва заметную сеточку; 3В – срез примерно в центре семени. На снимке видны проводящие пучки, идущие вдоль швов плода; 3Г–3И – созревшее семя со сформировавшейся проводящей системой; 3Г – светлыми линиями с сеточной структурой выделена проводящая система кожуры плода (1). 3Д – в центральной части – проводящие пучки кожуры семени (3), идущие от линии рубчика к противоположной стороне семени. На 3Е появляются прокамбиальные тяжи внутри семядолей (4) в их внешней части. 3Ж–3З – срезы в центральной части семени, содержащие зародышевую ось; на 3И – срез в третьей перпендикулярной плоскости – планарной, проходящей через зародышевую ось.

Прокамбиальные ткани внутри семядолей образуют разветвленные тяжи, идущие от зародышевой оси. На 3З видна проводящая ткань внутри зародышевой оси (6), фуникулуса (7) и крупный проводящий пучок ниже рубчика (8), а также проводящие пучки вдоль брюшного шва (5).

Срез в планарной проекции (рис. 3И) позволяет более четко зафиксировать проводящую ткань в области зародышевой оси.

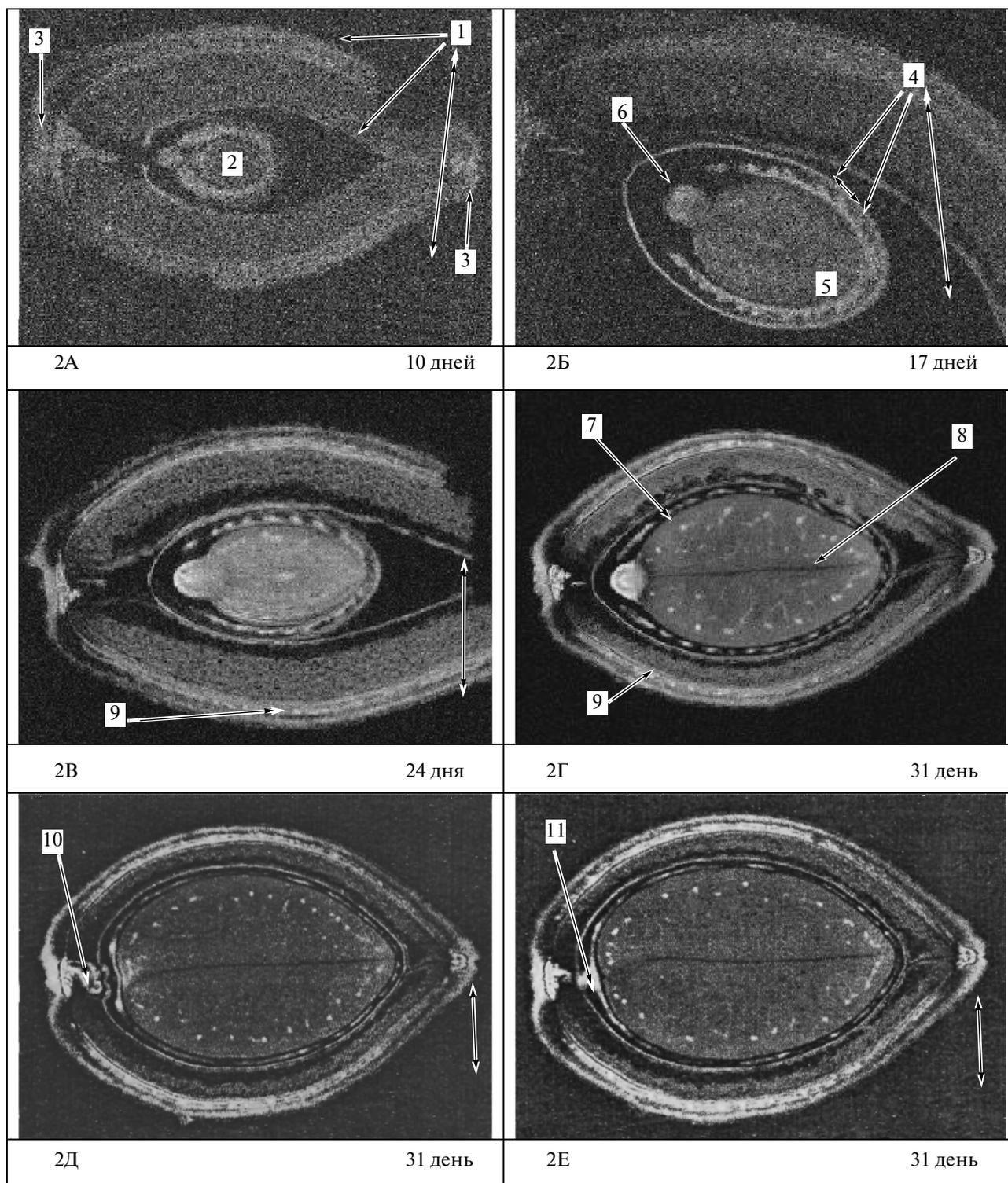


Рис. 2. Поперечные томографические срезы плодов *Phaseolus limensis* на разных стадиях созревания. Рисунки сделаны при различном увеличении, белыми стрелками показан масштаб 5 мм. Расположение плодов в контуре соответствует рис. 1А. Томограммы получены методом градиентного эха используя матрицу 512×512 пикселей и поле наблюдения 1.5 см для 2А и 2Б; 2.5 см для 2В и 3 см для остальных (2Г, Д и Е). Толщина срезов составляет 0.3 мм для 2А и 2Б, 0.4 мм для 2В и 0.7 мм для 2Г, Д и Е. На рисунке цифрами обозначены: 1 – кожура плода, 2 – зародыш, 3 – проводящие пучки в боковых швах плода, 4 – кожура семени с проводящими пучками, 5 – семядоли, 6 – зародышевая ось, далее – проводящие пучки кожуры семени (7), семядолей (8) и кожуры плода (9), ткани фуникулуса (10) и крупный проводящий пучок под рубчиком (11). Подробное описание рисунка дано в тексте.

ОБСУЖДЕНИЕ

Семена бобовых являются хорошими модельными объектами для исследования процессов роста и развития семян, изучения потоков питательных веществ в процессе онтогенеза и факторов, контролирующих эти потоки, а также возможности получать более ценные пищевые продукты. Поэтому их структура и ростовые процессы интенсивно исследуются и в настоящее время.

Ткани и проводящие пучки кожуры плода

Стенки плода образуются из плодолистика, свернутого вдоль по его главной (средней) жилке, и соединенного краями (Bailey and Swamy, 1951). Край стручка, на котором возникают яйцеклетки, называется брюшным швом, он содержит брюшные или латеральные (Эсау, 1980) сосудистые связки. На противоположной стороне стручка спинной шов содержит также сосудистые связки (Reeve and Brown, 1968). На томограммах они представлены несколькими мощными параллельными тяжами, (рис. 3Ж и 3З) и обозначены цифрой 5. Створки плодов покрыты сеткой проводящих пучков, напоминающей жилкование в листьях; в морфологии растений завязь считается модификацией листового образования (Александров, 1954).

Все сосудистые ткани стен стручка возникают в пределах молодой внешней паренхимы в течение цветочного и раннего послецветочного роста (Reeve and Brown, 1968). Сосудистые связки никогда не развиваются во внутренней зоне паренхимы. Уже на ранней стадии роста (10 дней) поверхность створок плода (рис. 3А) покрыта сеткой мелких еле различимых проводящих пучков, которые с ростом плода становятся более мощными (рис. 3Г, 1) и содержат как флоэмные, так и ксилемные элементы. В мелких жилках возможны неполные (только флоэма) проводящие пучки (Яковлев, 1991). Поскольку внешняя паренхима стручка содержит хлоропласты (Эсау, 1980), она может выполнять ассимиляционную функцию, подводя питательные вещества через флоэмные элементы створок к латеральным сосудистым связкам в дополнение к потокам ассимилятов из листьев.

Ткани и проводящие пучки кожуры семян

Ранее признавалась только защитная функция кожуры зрелых семян. В настоящее время многочисленными исследованиями установлено, что кожура семян бобовых — многофункциональный орган, поставляющий питательные вещества к зародышу в течение развития семени (Thorne, 1985; Murray, 1987; Zhang et al., 2007 и др.).

Архитектура проводящих пучков семенной кожуры в семействе Fabaceae является изменчивой и может иметь таксонометрическое значение. Так, семена сои (*Glycine max*) и фасоли (*Phaseolus*

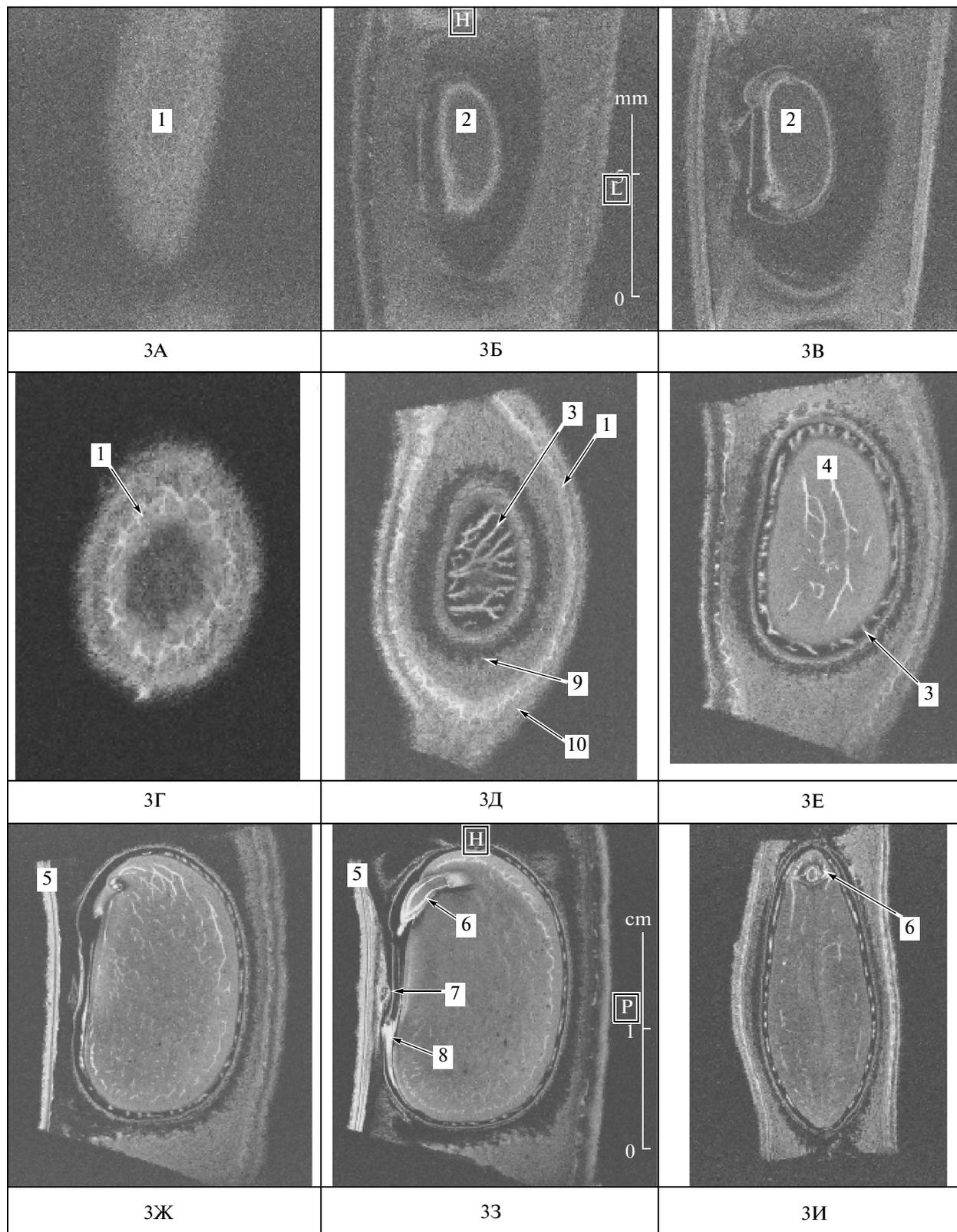
vulgaris), которые относятся к трибе Phaseoleae, имеют семенную кожуру с разветвленной сеткой проводящих пучков; в то же время семенная кожура гороха (*Pisum sativum*) и бобов (*Vicia faba*), которые относятся к трибе Viciae, содержит только одну халазальную жилку с двумя латеральными ветвями (Van Dongen et al., 2003).

Кожура семени является генетически материнским органом, зародыш является дочерним органом. Между зародышем и растением матери посредничает кожура семени. В течение фазы созревания, сахароза и другие питательные вещества поступают в семена через брюшную сосудистую систему, локализованную вдоль по стручку, в область вокруг рубчика и от него разветвляются по коже до противоположной стороны семени.

Строение семенной кожуры фасоли изучалось многократно с использованием световой и электронной микроскопии. Было показано, что она многослойная. Детали ее строения можно найти в работах (Sterling, 1954; Эсау, 1980; Zhou et al., 2007 и др.). На рис. 4А приведен снимок поперечного среза кожуры из (Zhou, 2007). Наружный слой составлен из макросклеридов. Под ним расположены клетки в виде песочных часов с большими межклетниками. Под ними расположена склеренхима — рыхлая ткань с большими промежутками между клетками. Далее идет основная паренхима, в средней части которой расположены проводящие пучки. За основной паренхимой расположен слой клеток разветвленной паренхимы (branch parenchyma), однако, в семенах сои эта часть семенной кожуры обозначена как аэренхима (Thorne, 1981).

На томограммах ткани семенной кожуры разделяются по интенсивности водного сигнала. Ткань наружного слоя с сильным сигналом от воды можно отнести к той части кожуры, которая содержит клетки макросклеридов, песочных часов и склеренхимы. Ее большая оводненность объясняется тем, что в районе рубчика проходят проводящие пучки, идущие от плаценты через фуникулус. Это хорошо видно на поперечных срезах рис. 2Д. В этот слой заходит несколько проводящих пучков, но они сообщаются только с внешним слоем кожуры, не содержащим проводящих пучков. Поскольку структура этого слоя довольно рыхлая, питательные растворы могут занимать там свободные места.

Темные на томограммах участки кожуры относятся к паренхимным тканям. Расположенные в них проводящие пучки связаны с латеральными тяжами плода через крупный проводящий пучок, вход которого четко фиксируется как на поперечных (рис. 2Е, 11), так и на продольных (рис. 3З, 8) томографических срезах. Этот вход расположен между рубчиком и линзой. Мы его увидели сначала в работе Анискина (Анискин, Сапрыкина,



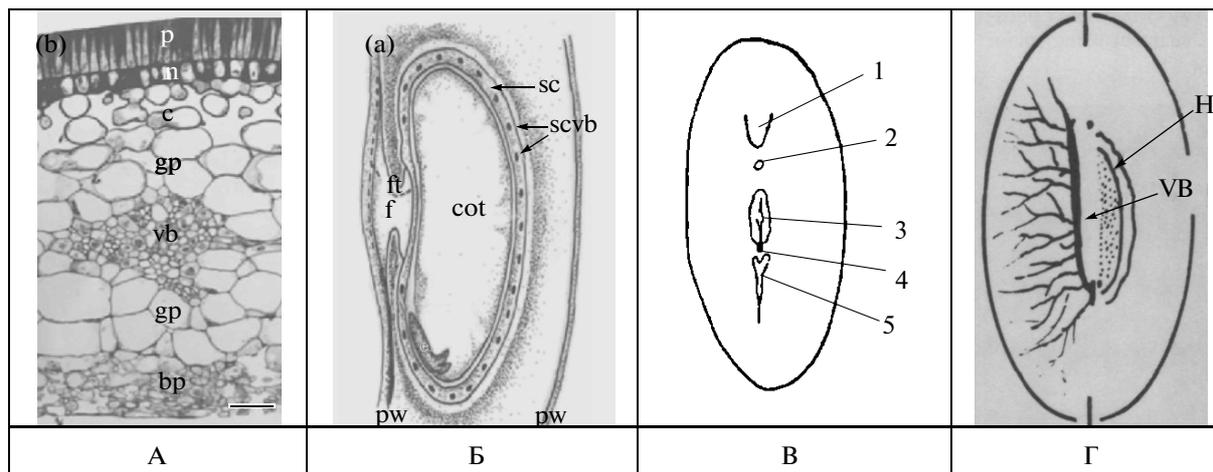


Рис. 4. А – поперечный срез кожуры семян *Phaseolus vulgaris*, полученный на световом микроскопе; р – палисадный слой; н – гиподерма; с – хлоренхима; gp – основная паренхима; bp – разветвленная паренхима; vb – проводящие пучки (воспроизводится из работы Zhou et al., 2007). Б – схематическое изображение семени фасоли *Phaseolus vulgaris* в плоде с проводящими пучками; pw – кожура стручка; f – фуникулус; ft – фуникулярный след; cot – семядоли; sc – кожура семени scvb – проводящие пучки в кожуре семени (воспроизводится из работы Zhou et al., 2007). В – Схематическое изображение области рубчика семени *Phaseolus*. 1 – корешок; 2 – микропиле; 3 – рубчиковая щель, 5 – строфиолум; 4 – место входа сосудистого пучка (воспроизводится из работы Анискина, Сапрыкина, 1962). Г – схематическое изображение проводящих пучков кожуры семян сои; Н – рубчик, VB – проводящие пучки (воспроизводится из работы Thorne, 1981).

1962), рисунок из которой приведен на рис. 4В, а затем зафиксировали на томограммах. Таким образом, томограммы дают два входа проводящих пучков в кожуру через плаценту и фуникулус. В упоминавшихся работах по исследованию транспорта ассимилятов в семена фасоли рассматривается только один единственный пучок через фуникулус, (напр., рис. 4Б).

Низкая оводненность паренхимы кожуры может быть связана с разрушением ее клеток (Эзау, 1980), заполнением ее клеточных оболочек пробкой, кутином, лигнином и пр. для придания прочности (Цингер, 1958), а также с облитерацией (Сравнительная..., 1996).

Наши данные по архитектуре проводящих пучков кожуры семян *Phaseolus limensis* хорошо согласуются с результатами, полученными микроскопическими методами для сои (Thorne, 1981), которые мы приводим на рис. 4Г. В этой работе показано, что, после входа в семенную кожуру крупный проводящий пучок соединяется с двумя другими, расположенными почти под прямым углом к нему и огибающими с двух сторон ткани рубчика. От этих больших связок с двух сторон по внутренней паренхиме кожуры отходят

многочисленные меньшие связки, анастомозируя неоднократно в пределах паренхимы. От мелких связок ассимиляты разгружаются в ткани паренхимы. Методом МРТ мы не обнаружили никакой сосудистой связи между кожей семени и семядолями растущего зародыша.

Проводящая система зародыша – семядолей и зародышевой оси

Томографическая методика позволила неразрушающим методом впервые зафиксировать формирование и архитектуру проводящих тканей зародыша.

Согласно Александрову нормально дифференцированные зародыши должны иметь хорошо выраженную проводящую систему, которая проходит в центре зачатков корня и стебля, давая разветвления в семядоли (Александров, 1954). По мнению Цингер она представлена прокамбиальными тяжами, которые из центрального цилиндра корешка переходят в семядоли и нередко образуют там анастомозы. Проводящая система зародыша – вполне самостоятельная, обособленная система и никакой связи между нею и

Рис. 3. Томограммы продольных срезов плодов *Phaseolus limensis*. 3А, Б и В получены на плодах через 10 дней после появления завязи; остальные снимки соответствуют сроку созревания 31 день. Расположение плодов в контуре соответствует рис. 1А. Томограммы получены методом градиентного эха используя матрицу 512 × 512 пикселей и поле наблюдения 1.5 см для 2А, Б и В и 3 см для остальных (2Г–И). Толщина срезов составляет 0.3 мм для всех. На рисунке цифрами обозначены: 1 – кожура плода с сеткой проводящих пучков, 2 – зародыш; далее цифрами обозначены проводящие пучки: 3 – кожуры семени, 4 – семядолей, 5 – брюшного шва плода, 6 – зародышевой оси. На рис. 3Д указаны наружная (10) и внутренняя (9) паренхима, разделенные проводящими пучками; на рис. 3З – ткань фуникулуса (7) и крупный проводящий пучок ниже рубчика (8). Подробное описание рисунка дано в тексте.

проводящими путями материнского растения нет (Цингер, 1958).

Проводящие ткани безусловно имеют примитивную структуру и представлены прокамбиальными тяжами, в зрелом семени согласно томографическим снимкам они пронизывают все его части, располагаясь в виде кольцевой зоны в корешке и гипокотиле, заходят в почечку (рис. 33), от зародыша они спускаются в семядоли, где образуют разветвленную сеть и особенно густо заполняют внешние части семядолей (рис. 3Ж). На томограммах мы не обнаружили связи между ними и проводящими пучками кожуры. Действительно, проводящая система зародыша является самостоятельной и она закладывается для того, чтобы начать функционировать при прорастании семян. Так, в зародыше арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) гистологическими исследованиями не были обнаружены никакие зрелые или дифференцированные сосудистые элементы и сосудистая система была представлена непрерывной сетью прокамбиальных клеток в корне, гипокотиле и семядолях. После прорастания семени прокамбий дифференцируется на ксилему и флоэму, и уже в 6-ти дневных проростках эти ткани можно различать (Busse and Evert, 1999).

Дифференцированные сосудистые элементы найдены также в гипокотиле 6-ти дневных проростков клешевины при томографическом исследовании (Verscht et al., 1998).

Пути поступления питательных веществ в плоды и семена фасоли. Вопрос этот многократно исследовался и является дискуссионным и сейчас. К настоящему времени признана модель, согласно которой необходимые для роста зародыша вещества ассимилируются в листьях и по проводящим пучкам поступают в створки боба, затем через фуникулус в семенную кожуру, ее проводящие пучки, вложенные в срединную часть внутренней основной паренхимы. Поскольку нет непосредственной связи этих каналов с зародышем, то из флоэмных элементов кожуры ассимиляты сливаются в передаточные клетки паренхимы, разгружаясь по всей длине жилок кожуры и по симпласту перемещаются от элементов решета в смежные сосудистые клетки паренхимы. Затем они транспортируются радиально внутрь симпластическим маршрутом и сливаются к семени через апопласт по межклеточному пространству (Patrick J.W., Offler C.E., 2001).

В процессе развития семян кожура должна импортировать излишки воды. Учитывая непроницаемость эпидермальной кутикулы, окружающей семенную кожуру, любая эвакуация воды от семени должна произойти через фуникулус и створки плода. Семена, вероятно, возвращают воду к проводящим пучкам стручка через ксилему кожуры, фуникулус, и жилки спинного шва, иначе бы по-

ступающий сок флоэмы растворялся. В пределах семенной кожуры вода должна возвратиться через ксилему (Pate et al., 1985; Peoples et al., 1985).

В работе показана возможность неразрушающим методом МРТ изучать процессы роста и формирования семян, их проводящей системы, анализировать пути поступления питательных веществ. Не достигая высокого уровня разрешения, характерного для световой и электронной микроскопии, метод МРТ позволяет работать с растительными объектами при отсутствии артефактов, связанных с разрушением образца.

Работа выполнена при поддержке целевой программы “Развитие научного потенциала высшей школы” по проекту РНП. 2.1.1/2584.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров В.Г. Анатомия растений. М.: Советская наука, 1954. 499 с.
- Анискин В.И., Сапрыкина Е.Г. О водопроницаемости семян кормовых бобов и люпина // Селекция и семеноводство. 1962. № 4. С. 18–22.
- Виноградова И.С., Фалалеев О.В. Применение магнитно-резонансной микротомографии для исследования внутреннего строения растений // Сельскохозяйственная биология. 2010а. № 3. С. 118–124.
- Виноградова И.С., Фалалеев О.В. Применение метода магнитно-резонансной микротомографии при изучении внутренней структуры семян бобовых культур // Вестник российской академии сельскохозяйственных наук. 2010б. № 6. С. 10–12.
- Коптюг И.В., Сагдеев Р.З. Современные физико-химические приложения ЯМР-томографии. Специфика метода и его применение для исследования объектов, содержащих жидкости // Успехи химии. 2002. Т. 71. № 7. С. 672–699.
- Ринки П.А. Магнитный резонанс в медицине / Пер. с англ. М.: Гэотар-Мед. 2003. 247 с.
- Физиология сельскохозяйственных растений. Том VI. Зернобобовые растения. Многолетние травы. Хлебные злаки. Под ред. Н.С. Туркова. М.: изд. МГУ, 1970. 654 с.
- Цингер Н.В. Семя, его развитие и физиологические свойства. М.: изд. АН СССР, 1958. 285 с.
- Эзау К. Анатомия семенных растений. Книга 2 / Пер. с англ. М.: Мир, 1980. 220–558 с.
- Яковлев Г.П. Бобовые земного шара. Ленинград: Наука, Ленинградское отделение, 1991. 123 с.
- Bailey I.W., Swamy B.G.L. The conduplicate carpel of dicotyledons and its initial trends of specification // Am. J. Botany. 1951. V. 38. P. 373–379.
- Blümich B., Kuhn W. Magnetic resonance microscopy: methods and application in materials science, agriculture and biomedicine. New York: VCH Publishers, 1992.
- Busse J.S., Evert R.F. Pattern of differentiation of the first vascular elements in the embryo and seedling of *Arabidopsis thaliana* // International Journal of Plant Science. 1999. V. 160. P. 1–13.

- Callaghan P.T. Principles of nuclear magnetic resonance microscopy. Oxford: Oxford University Press, 1991. 512 p.
- Chudek J.A., Hunter G. Magnetic resonance imaging of plants // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 1997. V. 31. P. 43–62.
- Ciobanu L., Webb A.G., Pennington C.H. Magnetic resonance imaging of biological cells // Progr. Nucl. Mag. Res. Sp. 2003. V. 42. P. 69–93.
- Connelly A., Lohman J.A.B., Loughman B.C. et al. High resolution imaging of plant tissue by NMR // J. Exp. Bot. 1987. V. 38. P. 1713–1723.
- Farrar T.C., Becker E.D. Pulse and Fourier transform NMR: introduction to theory and methods. New York: Academic Press, 1971.
- Foster M.P., Hutchinson J.M.S. Practical NMR imaging. Oxford: IRL Press, 1987.
- Garnczarska M., Zalewski T., Kempka M. Water uptake and distribution in germinating lupine seeds studied by magnetic resonance imaging and NMR spectroscopy // Physiologia Plantarum. 2007. V. 130. P. 23–32.
- Garnczarska M., Zalewski T., Wojtyla L. A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds // J. Plant Physiology 2008. V. 165. P. 1940–1946.
- Glidewell S.M., Williamson B., Goodman B.A. et al. An NMR microscopic study of grape (*Vitis vinifera* L.) // Protoplasma. 1997. V. 198. P. 27–35.
- Glidewell S.M. NMR imaging of developing barley grains // Journal of Cereal Science. 2006. V. 43. P. 70–78.
- Goodman B.A., Williamson B., Chudek J.A. Nuclear magnetic resonance (NMR) micro-imaging of raspberry fruit: further studies on the origin of the image // New Phytologist. 1992. V. 122. P. 529–535.
- Gyngell M.L. The application of steady-state free precession in rapid 2DFT NMR imaging: FAST and CE-FAST sequences // Magnetic Resonance Imaging. 1988. V. 6. P. 415–419.
- Hausser K.H., Kalbitzer H.R. NMR in medicine and biology: structure determination, tomography, in vivo spectroscopy. Berlin, Heidelberg.: Springer-Verlag, 1991.
- Horigane A.K., Takahashi H., Maruyama S. et al. Water penetration into rice grains during soaking observed by gradient echo magnetic resonance imaging // Journal of Cereal Science. 2006. V. 44. P. 307–316.
- Ishida N., Koizumi M., Kano H. The NMR microscope: a unique and promising tool for plant science // Annals of Botany. 2000. V. 86. P. 259–278.
- Ishida N., Naito S., Kano H. Loss of moisture from harvested rice seeds on MRI // Magnetic Resonance Imaging. 2004. V. 22. P. 871–875.
- Kikuchi K., Koizumi M., Ishida N. et al. Water uptake by dry beans observed by micro-magnetic resonance imaging // Annals of Botany. 2006. V. 98. P. 545–553.
- Köckenberger W., Pope J.M., Xia Y. et al. A non-invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear magnetic resonance micro-imaging // Planta. 1997. V. 201. P. 53–63.
- Köckenberger W. Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments // Trends in Plant Science. 2001. V. 6. № 7. P. 286–292.
- Köckenberger W., De Panfilis C., Santoro D. et al. High resolution NMR microscopy of plants and fungi // J. Microsc. 2004. V. 214. P. 182–189.
- Lauterbur P.C. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance // Nature. 1973. V. 242. P. 190–191.
- MacFall J.S., Johnson G.A. The architecture of plant vasculature and transport as seen with magnetic resonance microscopy // Canadian Journal of Botany. 1994. V. 72. P. 1561–1573.
- Manz B., Muller K., Kucera B. et al. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *in vivo* by nuclear magnetic resonance imaging // Plant Physiology. 2005. V. 138. P. 1538–1551.
- Morris P.G. Nuclear magnetic resonance imaging in medicine and biology. Oxford.: Clarendon Press, 1986. 278 P.
- Murray D.R. Nutritive role of seed coats in developing legume seeds // American Journal of Botany. 1987. V. 74. P. 1122–1137.
- Öpik H. Development of cotyledon cell structure in ripening *Phaseolus vulgaris* seeds // Journal of Experimental Botany. 1968. V. 19. № 58. P. 64–76.
- Pate J.S., Kuo J., Van Bel A.J.E. et al. Diurnal water balance of the cowpea fruit // Plant Physiol. 1985. V. 77. P. 148–156.
- Patrick J.W., Offler C.E. Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 551–564.
- Peoples M.B., Pate J.S., Atkins C.A. et al. Economy of water, carbon and nitrogen in the developing cowpea fruit // Plant Physiol. 1985. V. 77. P. 142–147.
- Pfeffer P.E., Gerasimowicz W.V. Nuclear magnetic resonance in agriculture. Boca Raton: CRC Press, 1989.
- Pietrzak L.N., Fregeau-reid J., Chatson B. et al. Observation on water distribution in soybean seed during hydration processes using nuclear magnetic resonance imaging // Canadian Journal of Plant Science. 2002. V. 82. P. 513–519.
- Reeve R.M., Brown M.S. Histological development of the green bean pod as related to culinary texture. 1. Early stages of pod development // J. of Food Science. 1968. V. 33 P. 321–326.
- Scheenen T.W.J., Van Dusschoten D., de Jager P.A. et al., Quantification of water transport in plants with NMR imaging // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 1751–1759.
- Scheenen T.W.J., Vergeldt F.J., Heemskerk A.M. et al. Intact Plant Magnetic Resonance Imaging to Study Dynamics in Long-Distance Sap Flow-Conducting Surface Area // Plant Physiology. 2007. V. 144. P. 1157–1165.
- Sterling C. Development of the seed coat of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) // Bulletin of the Torrey botanical club. 1954. V. 81, № 4. P. 271–287.
- Thorne J.H. Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds // Annual Review of Plant Physiology. 1985. V. 36. P. 317–343.
- Van As H., Scheenen T.W.J., Vergeldt F.J. MRI of intact plants // Photosynth. Res. 2009. V. 102. P. 213–222.
- Van Dongen J.T., Ammerlaan A.M.H., Wouterlood M. et al. Structure of the developing pea seed coat and the post-

- phloem transport pathway of nutrients // *Annals of Botany*. 2003. V. 91. P. 729–737.
- Verscht J., Kalusche B., Köhler J. et al. The kinetics of sucrose concentration in the phloem of individual vascular bundles of the *Ricinus communis* seedling measured by nuclear magnetic resonance microimaging // *Planta*. 1998. V. 205. P. 132–139.
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U. Molecular physiology of legume seed development // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. V. 56. P. 253–279.
- Williamson B., Goodman B.A., Chudek J.A. et al. The vascular architecture of the fruit receptacle of red raspberry determined by 3D NMR microscopy and surfacerendering techniques // *New Phytologist*. 1994. V. 128. P. 39–44.
- Xia Y., Sarafis V., Campbell E.O. et al. Non invasive imaging of water flow in plants by NMR microscopy // *Protoplasma*. 1993. V. 173. P. 170–176.
- Zhang W.H., Zhou Y., Dibley K.E. et al. Nutrient loading in developing seeds // *Functional Plant Biology*. 2007. V. 34. P. 314–331.
- Zhou Y., Setz N., Niemiets C. et al. Aquaporins and unloading of phloem-imported water in coats of developing bean seeds // *Plant, Cell and Environment*. 2007. V. 30. P. 1566–1577.

Formation of the Vascular System of Developing Bean (*Phaseolus limensis* L.) Seeds According to Nuclear Magnetic Resonance Microtomography

I. S. Vinogradova^a and O. V. Falaleev^b

^a Siberian State Technological University, pr. Mira 82, Krasnoyarsk, 660049 Russia
e-mail: vis@akadem.ru

^b Kirenskii Institute of Physics, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok-50, 38, 660036 Russia
e-mail: falaleev_ov@mail.ru

Abstract—¹H magnetic resonance microtomography imaging was applied to study vascular systems in developing bean (*Phaseolus limensis* L.) seeds. Using the gradient echo method, we recorded 2D tomographic sections in the sagittal and axial planes of the fruits sampled from a vegetating plant on days 10, 17, 24, and 31 after fertilization. Any vascular connection between the tissues of maternal plant (bean pod and seed coat) and the embryo were undetectable. The embryo has an autonomous branched network of procambial strands in the cotyledons, converging to the embryonic axis. The bean pods are covered with a network of vascular bundles; large vascular strands run along the dorsal and ventral sutures. The seed coat vascular bundles are formed in the process of seed ripening and are represented by a developed vascular system multiply branching in the middle part of the ground parenchyma at the stage of physiological maturity. They are connected with the source of assimilates via the lateral pod veins and a large vascular bundle, entering the seed below the hilum via the placenta. Assimilates enter the external part of the seed coat, which contains no vascular bundles, via the funiculus vascular bundles and hilum tissue.

Keywords: ¹H magnetic resonance microtomography, lima bean (*Phaseolus limensis*) seeds, seed development and ripening, vascular bundles, transport of assimilates