

УДК 581.5+574.24

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИСТЬЕВ ЛУГОВЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРИЙ МАЛОГО КАВКАЗА

Е.И. ЧХУБИАНИШВИЛИ, Ш.Ш. ЧАНИШВИЛИ, Н.Ф. КАЧАРАВА, Г.Ш. БАДРИДЗЕ

*Тбилисский ботанический сад и Институт ботаники
0105 Тбилиси, Коджорское шоссе, 1, Грузия*

Изучена структура листьев, интенсивность фотосинтеза, содержание пластидных пигментов, антоцианов и белков в листьях одуванчика, клевера и подорожника, произрастающих на разных высотах Малого Кавказа в диапазоне 1400—2450 м над уровнем моря. С увеличением высоты местообитания наблюдалось утолщение мезофилла, эпидермального слоя, развитие широкого слоя губчатой ткани, возрастание содержания антоцианов, каротиноидов, белков и существенное уменьшение интенсивности потенциального фотосинтеза. Содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* коррелирует с интенсивностью ассимиляции CO₂ ($r = 0,86...0,92$). Полученные результаты свидетельствуют о структурной и физиолого-биохимической адаптации луговых растений к стрессовым условиям высокогорий Малого Кавказа.

Ключевые слова: анатомия листа, фотосинтез, пластидные пигменты, антоцианы, белки.

В ходе эволюции у растений высокогорий выработался ряд приспособительных признаков. Адаптивные процессы в первую очередь связаны со структурами органелл, клеток, тканей, которые имеют специфические пространственные взаимоотношения друг с другом внутри листа [1, 4]. Анатомия листа предопределяет физиологические процессы в нем и, в конечном счете, эволюционную адаптацию растений к экологическим особенностям различных мест обитания [16]. Многолетними исследованиями Пьянков [6, 7] установил, что не существует единого характера изменений структуры фотосинтетического аппарата растений в зависимости от высоты обитания. Параметры листа, такие как площадь, толщина, количество слоев мезофилла, объем клеток и их количество на единицу листовой поверхности, могут уменьшаться или увеличиваться.

Целью данной работы было изучение анатомических особенностей листьев, фотосинтетической активности, содержания пластидных и антоциановых пигментов, общего количества белков у луговых растений, произрастающих в высотном градиенте 1400—2450 м над уровнем моря на Малом Кавказе.

Методика

Исследования проводились на Малом Кавказе в окрестностях Боржомского ущелья в районе с. Бакуриани. Материал для анализов собирали в четырех пунктах, расположенных на разных высотах: в окрестностях

с. Цеми — 1400 м над уровнем моря, в ботаническом саду с. Бакуриани — 1700 м, в субальпийском поясе — на перевале Цхра Цкаро — 2000 и 2450 м над уровнем моря.

Изучали двудольные травянистые растения, широко распространенные среди луговых трав на всех указанных выше высотах: одуванчик — *Taraxacum officinale* Wgg., клевер — *Trifolium medium* L., подорожник — *Plantago major* L. Отбор растений производили в конце июля — начале августа в фазу цветения.

Для анатомических исследований образцы листьев среднего яруса фиксировали в 70° этаноле. Срезы получали с помощью замораживающего микротомы (модель X, ПРАПОР, Россия) толщиной 25 мкм. Из 30—50 срезов выборочно отбирали и измеряли по 10—15 образцов. Структуру листьев изучали с помощью светового микроскопа (МБИ-6, Россия).

Потенциальную интенсивность фотосинтеза определяли в полевых условиях радиометрическим методом с использованием $^{14}\text{CO}_2$ [2]. Радиоактивность измеряли счетчиком Т-25 БФЛ (Россия). Содержание пластидных пигментов определяли спектрофотометрически (Specol II, Carl Zeiss, Германия), концентрацию пигментов рассчитывали по формуле Ветштейна [3].

Для определения количества антоциановых пигментов к 1 г тщательно измельченных листьев добавляли раствор, содержащий 20 мл этанола и 2 мл 1 %-го раствора HCl. Оптическую плотность экстракта измеряли на спектрофотометре при длине волны 529 нм, концентрацию антоциановых пигментов рассчитывали по формуле, приведенной в работе [3].

Для определения общего количества белков свежесобранные листья тщательно измельчали и последовательно обрабатывали 5 %- и 1 %-м растворами трихлоруксусной кислоты, хлорофилл удаляли ацетоном. Растительный материал обрабатывали в условиях холодной камеры при температуре 4 °С. Гидролиз белков производили 0,5 М NaOH на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Содержание белков определяли на спектрофотометре с красным светофильтром при длине волны 750 нм с использованием реактива Фолина [18].

Количества пигментов и белков определяли в пяти аналитических повторностях. Для усреднения материала брали по 5—10 листьев с 5—10 растений. Результаты подвергали дисперсионному анализу (ANOVA) с помощью версии Sigma Stat 3.0. С использованием теста Dunnet вычисляли уровень достоверности *p*. В таблицах и на рисунке представлены средние величины и их стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение

Наряду с общими для большинства горных районов факторами среды — повышенным фоном ультрафиолетовой радиации и освещенности, пониженной температурой, резкими ее колебаниями в течение суток, низкими атмосферным давлением и концентрацией углекислого газа для изучаемого региона Малого Кавказа характерна высокая влажность, в зимнее время — обильный снежный покров, в летнее — туманы. Совокупность абиотических факторов была предпосылкой для структурных и физиолого-биохимических приспособительных реакций исследуемых растений региона.

Установлено, что наряду с ксероморфными признаками — увеличением толщины листовой пластинки, числа слоев клеток палисадной ткани, вытянутостью палисадных клеток (клевер, подорожник) проявились и черты строения, свойственные мезофитам: довольно большая рыхлость мезофилла, хорошо развитая система межклетников, расположение устьиц по обеим сторонам листа (одуванчик, подорожник), что увеличивает проводимость CO_2 и имеет адаптивное значение в условиях разреженной атмосферы [5, 6]. Для изученных видов характерен дорзовентральный тип строения мезофилла, который обычно формируется в условиях влажного климата [6].

Характерной особенностью изменения структуры листьев исследованных растений с высотой их произрастания является увеличение толщины мезофилла листьев и эпидермального слоя (табл. 1). Толщина губчатой ткани в листьях растений на всех изученных высотах превосходит толщину палисадной на 10—25 %. В листьях одуванчика и подорожника в субальпийской зоне на высоте 2450 м над уровнем моря по сравнению с нижним поясом (1400 м над уровнем моря) толщина губчатой паренхимы возрастает почти вдвое.

Известно, что палисадная и губчатая ткани находятся в разных световых условиях. Большая часть фотосинтетически активной радиации (ФАР) поглощается в палисадной ткани, на долю губчатой приходится от 10 до 25 % общего поглощения ФАР [13, 19]. Естественно, вклад в суммарный фотосинтез листа палисадной и губчатой ткани будет различным.

В субальпийской зоне на высоте 2000—2450 м над уровнем моря интенсивность потенциального фотосинтеза уменьшается в два—три раза (рисунок, а). Изменение интенсивности фотосинтеза по высотному профилю Малого Кавказа коррелирует с изменением суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* ($r = 0,86...0,92$) (табл. 2).

Абсорбция света листьями при фотосинтетической фиксации CO_2 зависит от концентрации хлорофилла [14]. По-видимому, на большой высоте интенсивный фон УФ-радиации и высокая инсоляция негативно влияют на функциональную активность хлоропластов. В субальпийской зоне уменьшение содержания фотосинтетических пигментов приводит к ослаблению активности потенциального фотосинтеза.

В приспособлении к экстремальным условиям особую роль играет эпидерма. Известно, что лишь 5—10 % УФ-радиации достигает клеток верхних слоев мезофилла, основная часть коротковолновых лучей поглощается растворенными в вакуолях эпидермиса защитными пигментами — флавоноидами, концентрация которых при действии повышенной УФ-радиации возрастает [13, 17]. Толстый слой эпидермы и тенденция к утолщению этого слоя у изученных растений играет адаптивную роль в приспособлении к повышенной УФ-радиации. В экстремальных условиях субальпийского пояса с увеличением высоты над уровнем моря в листьях одуванчика, клевера и подорожника активизируется синтез антоцианов (см. рисунок, б) и каротиноидов, что подтверждается уменьшением отношения хлорофиллы: каротиноиды (см. табл. 2). Каротиноиды играют важную роль в механизмах защиты фотосинтетического аппарата от различных повреждающих факторов окружающей среды. Они перехватывают избыток энергии возбужденного хлорофилла и рассеивают его в виде тепла, элиминируют активные формы кислорода, образующиеся при фотосинтетическом стрессе [8].

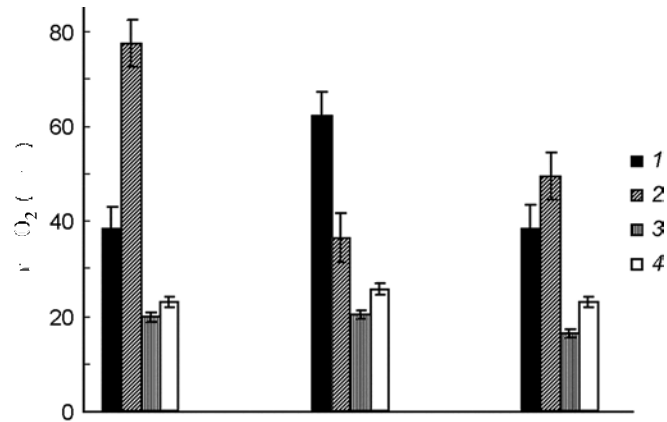
ТАБЛИЦА 1. Показатели анатомической структуры листьев луговых растений, произрастающих на разных высотах

Растение	Высота над уровнем моря, м	Толщина, мкм			
		Лист	Палисадная ткань	Губчатая ткань	Верхний эпидермис
Одуванчик	1400	135 ± 8	48 ± 2	56 ± 2	16 ± 0,1
	1700	193 ± 3	68 ± 2	87 ± 1	18 ± 0,1
	2000	211 ± 5	78 ± 2	94 ± 1	19 ± 0,1
	2450	231 ± 3	86 ± 3	102 ± 3	20 ± 0,6
Клевер	1400	102 ± 3	36 ± 3	42 ± 2	12 ± 0,1
	1700	114 ± 6	42 ± 3	45 ± 2	12 ± 0,1
	2000	129 ± 5	48 ± 3	50 ± 3	15 ± 0,2
	2450	134 ± 9	48 ± 2	53 ± 3	17 ± 0,1
Подорожник	1400	142 ± 2	58 ± 2	53 ± 3	15 ± 0,6
	1700	176 ± 3	66 ± 3	79 ± 2	15 ± 0,1
	2000	190 ± 2	74 ± 2	83 ± 1	17 ± 0,2
	2450	220 ± 2	80 ± 2	100 ± 3	19 ± 0,3

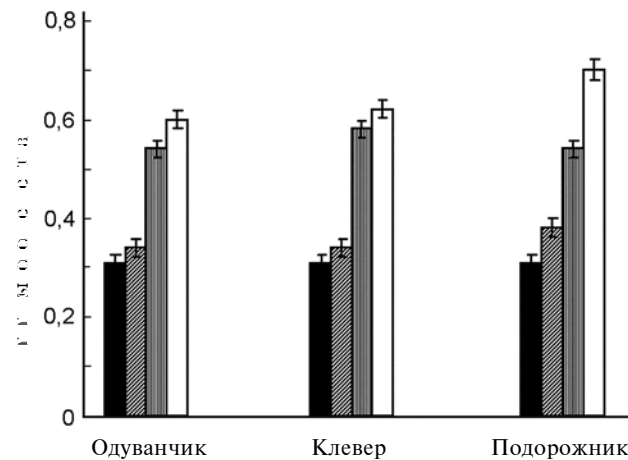
Примечание. Изменение толщины листьев по отношению к высотному фактору статистически достоверно для растений одуванчика при $p < 0,001$, для клевера — $p = 0,018$, для подорожника — $p = 0,905$. Достоверность изменения толщины палисадной и губчатой тканей по отношению к высотному фактору значима при $p = 0,001$.

ТАБЛИЦА 2. Содержание пластидных пигментов в листьях луговых растений, произрастающих на разных высотах, мг/г сырого вещества

Растение	Высота над уровнем моря, м	Хлорофилл			Каротиноиды	Хлорофиллы/Каротиноиды
		a	b	a + b		
Одуванчик	1400	1,21 ± 0,10	1,18 ± 0,05	2,39	0,79 ± 0,01	3,02
	1700	1,30 ± 0,30	1,25 ± 0,02	2,55	0,79 ± 0,01	3,22
	2000	0,97 ± 0,05	0,70 ± 0,01	1,67	0,80 ± 0,02	2,08
	2450	0,87 ± 0,03	0,70 ± 0,01	1,57	0,81 ± 0,02	1,93
				$p = 0,074$	$p < 0,056$	$p = 0,001$
Клевер	1400	1,70 ± 0,02	1,44 ± 0,03	3,14	0,92 ± 0,04	3,14
	1700	1,53 ± 0,02	1,30 ± 0,05	2,83	1,76 ± 0,02	1,60
	2000	1,49 ± 0,04	1,13 ± 0,04	2,62	1,89 ± 0,08	1,38
	2450	1,39 ± 0,02	1,01 ± 0,02	2,40	2,14 ± 0,09	1,12
				$p = 0,021$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Подорожник	1400	1,70 ± 0,03	0,43 ± 0,01	2,13	0,53 ± 0,02	4,01
	1700	2,00 ± 0,02	0,95 ± 0,02	2,95	0,64 ± 0,01	4,60
	2000	0,91 ± 0,02	0,84 ± 0,01	1,75	0,65 ± 0,04	2,69
	2450	0,82 ± 0,01	0,77 ± 0,01	1,59	0,66 ± 0,03	2,40
				$p < 0,004$	$p < 0,001$	$p < 0,001$



а



б

Интенсивность потенциального фотосинтеза ($\text{mg CO}_2/(\text{g} \cdot \text{ч})$) в расчете на сухое вещество (а) и содержание антоциановых (mg/g сырого вещества) пигментов (б) в листьях луговых растений, произрастающих на разной высоте над уровнем моря:

1 — 1400 м; 2 — 1700; 3 — 2300; 4 — 2450 м (представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения; максимальная относительная погрешность 5%; изменения интенсивности фотосинтеза по отношению к высотному фактору достоверны при $p < 0,001$; изменения антоцианов при $n = 5$ достоверны при $p = 0,001$)

Антоцианы — эффективные фенольные антиоксиданты, обладающие структурой, которая способствует обезвреживанию свободных радикалов.

Известно, что одной из причин усиленного синтеза антоцианов является повышенный фон УФ-радиации [11]. Низкие температуры также стимулируют биосинтез этих пигментов [10]. Увеличение содержания антоцианов в листьях луговых растений по высотному профилю Малого Кавказа можно связать как с повышенным фоном УФ-радиации, так и с влиянием низких температур.

Проведенным исследованием выявлена тенденция к накоплению белков в листьях луговых растений Малого Кавказа (табл. 3).

Из литературы известно, что при высоких дозах УФ-радиации в растениях подавляется синтез большинства обычных белков, тогда как синтез стрессовых белков индуцируется [12, 19]. Поэтому можно пред-

ТАБЛИЦА 3. Содержание общего белка в листьях луговых растений, произрастающих на разных высотах, мг/г сырого вещества

Высота над уровнем моря, м	Растение		
	Одуванчик	Клевер	Подорожник
1400	3,2 ± 0,3	11,2 ± 0,7	3,2 ± 0,5
1700	3,8 ± 0,1	12,8 ± 0,3	8,3 ± 0,5
2000	6,4 ± 0,3	14,4 ± 0,8	9,6 ± 0,3
2450	11,2 ± 0,5	19,2 ± 0,8	14,4 ± 0,8

Примечание. Достоверность изменения содержания общих белков по отношению к высотному фактору для одуванчика и клевера $p < 0,001$, для подорожника — $p < 0,009$.

положить, что с ростом высоты местообитания увеличение содержания белков в листьях изученных луговых растений связано с накоплением стрессовых белков, защищающих клеточные структуры и ДНК от повреждений в условиях повышенной УФ-радиации [15].

Таким образом, выявлены общие черты приспособления луговых растений к климатическим факторам высокогорий Малого Кавказа в диапазоне 1400—2450 м над уровнем моря. Из них следует выделить структурную адаптацию листьев, уменьшение интенсивности потенциального фотосинтеза, коррелирующего с суммарным содержанием хлорофиллов, накопление защитных пигментов — антоцианов и каротиноидов, накопление белков.

1. Вознесенская Е.В. Структура фотосинтетического аппарата у представителей древесных форм высокогорий Восточного Памира // Физиология растений. — 1996. — **43**. — С. 391—398.
2. Вознесенский В.И., Зеленский О.В., Семихатова О.А. Методы исследования фотосинтеза и дыхания растений. — М.; Л.: Наука, 1965. — 304 с.
3. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимических исследований растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
4. Лархер В. Климатический стресс и поведение растений в высокогорьях. Экология высокогорий. — Тбилиси: Мецниереба, 1988. — 270 с.
5. Мирославов Е.А., Кравкина И.М. Сравнительная анатомия листа растений, произрастающих в горах на разных высотах // Ботан. журн. — 1990. — **75**, № 3. — С. 368—375.
6. Пьянков В.И., Кондрачук А.В. Мезоструктура фотосинтетического аппарата древесных растений Восточного Памира различных экологических и высотных групп // Физиология растений. — 1998. — **45**, № 4. — С. 567—577.
7. Пьянков В.И., Кондрачук А.В. Основные типы структурных перестроек мезофилла листа растений Восточного Памира при адаптации к высокогорным условиям // Там же. — 2003. — **50**, № 1. — С. 34—42.
8. Стржалка К., Костецка-Гугала А., Латовски Д. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами // Там же. — 2003. — **50**, № 2. — С. 188—193.
9. Barnes P., Searles P., Ballare C. et al. Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence in field and laboratory studies // *Physiol. Plant.* — 2000. — **109**, N 3. — P. 274—283.
10. Borman J., Szilagyi A., Hideg E. Role of plant phenolics in UV-protection // 29 Annual Meeting of the American Society of Photobiology. — Chicago, 2004. — Abstracts.
11. Boston R.S., Vittanen P.V., Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plants // *Plant Mol. Biol.* — 1996. — **32**. — С. 191—222.
12. Coldwell M.M., Robberecht R.E., Lint S.D. Internal filters: prospect for UV-acclimation in higher plants // *Physiol. Plant.* — 1983. — **58**. — P. 445—450.
13. Evans J.R. Carbon fixation profiles do reflect light absorption profiles in leaves // *Aust. J. Plant Physiol.* — 1995. — **22**. — P. 865—873.

14. *Jansen M.A.K., Gaba V., Greenberg B.M.* Higher plants and UV-B radiation: balancing damage. Repair and acclimation // Trends Plant Sci. — 1998. — 3. — P. 131—136.
15. *Korner Ch., Bunnister P., Mark A.* Altitudinal variation in stomatal conductance, nitrogen content and leaf anatomy in different plant life forms in New Zealand // Ecology. — 1986. — 69. — P. 577—588.
16. *Larcher W.* Physiological Plant Ecology, Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. — Berlin; Heidelberg; New York : Springer-Verlag, 1995. — 494 p.
17. *Lowry O.H., Rosebrough N.T., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 139. — P. 265—275.
18. *Nedunchezian N., Annamalaiathan K., Kulandavelu G.* Induction of heat shock-like proteins in vignasinensis seedlings growing under ultraviolet-B (280—320 nm) enhanced radiation // Physiol. plant. — 1992. — 85. — P. 503—506.
19. *Vogelmann T.C.* Plant tissue optics // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1993. — 44. — P. 231—251.

Получено 16.07.2008

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ЛИСТКІВ ЛУЧНИХ РОСЛИН В УМОВАХ ВИСОКОГІР'ІВ МАЛОГО КАВКАЗУ

Є.О. Чхубіанішвілі, Ш.Ш. Чанішвілі, Н.Ф. Качарава, Г.Ш. Бадридзе

Тбіліський ботанічний сад і Інститут ботаніки

Вивчено структуру листків, інтенсивність фотосинтезу, вміст пластидних пігментів, антоціанів і білків у листках кульбаби, конюшини і подорожника, що ростуть на різних висотах Малою Кавказу в діапазоні 1400—2450 м над рівнем моря. Зі збільшенням висоти місця оселення спостерігалось потовщення мезофілу, епідермального шару, розвиток широкого шару губчастої тканини, підвищення вмісту антоціанів, каротиноїдів, білків та істотне зменшення інтенсивності потенціального фотосинтезу. Вміст суми хлорофілів *a* і *b* корелює з інтенсивністю асиміляції CO₂ ($r = 0,86...0,92$). Отримані результати засвідчують структурну і фізіолого-біохімічну адаптацію лучних рослин до стресових умов високогір'їв Малою Кавказу.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MEADOW PLANTS UNDER THE CONDITIONS OF MINOR CAUCASUS

E. I. Chkhubianishvili, Sh.Sh. Chanishvili, N.F. Kacharava, G.Sh. Badridze

Tbilisi Botanical Garden and Institute of Botany
1 Kodjori road, Tbilisi, 0105, Georgia

Leaf structure, photosynthetic activity, content of plastid pigments, anthocyanins and total proteins have been studied in leaves of dandelion, clover and plantain growing at different altitudes of the Minor Caucasus in range of 1400—2450 m above sea level. Increase of mesophyll thickness, epidermal layer and spongy parenchyma was established. Also rising of the content of anthocyanins, carotenoids, total protein and significant decline of potential rate of photosynthesis were mentioned. Content of chlorophylls *a* and *b* sum correlated with the intensity of CO₂ assimilation ($r = 0.86...0.92$). Obtained results indicate structural, physiological and biochemical adaptation of meadow grasses under the stress conditions of mountains of the Minor Caucasus.

Key words: leaf anatomy, photosynthesis, plastid pigments, anthocyanins, proteins.