

УДК 57.012.4:581.821

## СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННИХ ОБОЛОНОК ЛИСТКІВ *SAGITTARIA SAGITTIFOLIA* L. ТА *TRAPA NATANS* L.

ОЛЕНА М. НЕДУХА

**Анотація.** Методом просвічуючої електронної мікроскопії досліджена ультраструктура клітинних оболонок епідерми та мезофілу листків *Sagittaria sagittifolia* та *Trapa natans*. Виявлені структурні особливості клітинних оболонок епідерми листків, занурених у воду, при порівнянні із клітинними оболонками епідерми надводних та плаваючих листків, зокрема, зниження товщини периклінальних оболонок епідермісу та поява розпушення мікрофібрил целюлози. Ультраструктурні зміни в оболонках підводних листків супроводжувалися збільшенням вмісту геміцелюлоз і лігніну, та зменшенням вмісту целюлози. Отримані дані обговорюються у зв'язку з апопластним водним транспортом листків, занурених у воду.

**Ключові слова:** *Sagittaria sagittifolia*, *Trapa natans*, епідерма, клітинні оболонки, листок

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ, Україна;  
o.nedukha@hotmail.com

### Вступ

Відомо, що підводні листки вищих повітряно-водних рослин характеризуються певними анатомо-морфологічними пристосуваннями до росту та активного функціонування у водному середовищі, для кого характерно ослаблення світлового потоку, нестача CO<sub>2</sub> та зміни дифузії газів у порівнянні з надводним повітряним середовищем (SMITH & WALKER 1981; ДОРОНІН 2000). Головні фенотипічні ознаки адаптації листків до водного середовища – це зміна форми, площі та їх анатомічної структури (МОММЕР *et al.* 2005; АРВЕР 2008; НЕДУХА 2011). Відомо, що у повітряних та плаваючих листків зовнішні клітинні оболонки епідерми та продихи замикаючих клітин листків є першим бар'єром і першим транспортним шляхом вуглекислого газу та води, а також місцем контакту органів рослини з оточуючим середовищем. Кутикула епідерми повітряних листків мезофітів містить пори, через які відбувається як кутикулярна транспірація, так і поглинання води (SCHÖNHERR 1982, 2006). Тоді як у більшості підводних листків повітряно-водних та водних рослин продихи

відсутні. Транспортні функції в основному припадають на периклінальні оболонки епідермісу листків.

Незважаючи на численні дані стосовно вивчення впливу затоплення на ріст і функціонування гідрофітів, для розуміння механізмів клітинної адаптації вищих рослин до природного затоплення, особливої уваги потребує дослідження структурно-функціональних особливостей клітинних оболонок епідерми підводних листків. Тому метою нашої роботи було порівняти ультраструктуру клітинних оболонок епідерми і фотосинтезуючої паренхіми підводних і надводних листків *Sagittaria sagittifolia* L. та *Trapa natans* L.

### Матеріали і методи досліджень

Досліджували листки стрілолиста звичайного (*S. sagittifolia*) та водяного горіха (*T. natans*) у фазі вегетативного росту. Рослини росли у прибережній зоні Русанівського каналу (р. Дніпро, м. Київ) на глибині до 80-100 см. Проводили порівняння ультраструктури клітинних оболонок підводних і надводних листків. Для просвічуючої електронної мікроскопії зразки



**Рис. 1.** Загальний вигляд надводних (А) та підводних (Б) листків *Sagittaria sagittifolia*, а також плаваючих (В) та підводних (Г) листків *Trapa natans*.

**Fig. 1.** Common view of air (A) and submerged (Б) leaves of *Sagittaria sagittifolia*, and of floating (В) and submerged (Г) leaves of *Trapa natans*.

підводних і надводних листків *S. sagittifolia* та плаваючих листків *T. natans* (серединну частину пластинки, на віддалі 4-5 мм від краю), а також серединну частину голкоподібних сегментів розсічених підводних листків *T. natans* у польових умовах фіксували 2,5% розчином глютарового альдегіду в 0,05 М какодилатному буфері, рН 7,2. Потім матеріал промивали відповідним буфером, дофіксували 2%  $\text{OsO}_4$ , зневоднювали етанолом та ацетоном і заливали у суміш епоксидних смол (епон/аралдит) (Недужа 2004). Ультраструктуру клітин досліджували під електронним мікроскопом JEM-1200EX.

Для визначення вмісту полісахаридів у клітинних оболонках брали по 9-11 підводних і по 7-9 надводних листків (без серединної жилки) з кожного виду. Загальний вміст целюлози, геміцелюлоз, лігніну, пектину та протопектину визначали за стандартними протоколами, використовуючи для гідролізу суху масу листових пластинок (Арасимович і Ермаков 1987). Біохімічні аналізи проводили у трьох повторностях.

## Результати та їх обговорення

### Загальна морфологічна характеристика листків

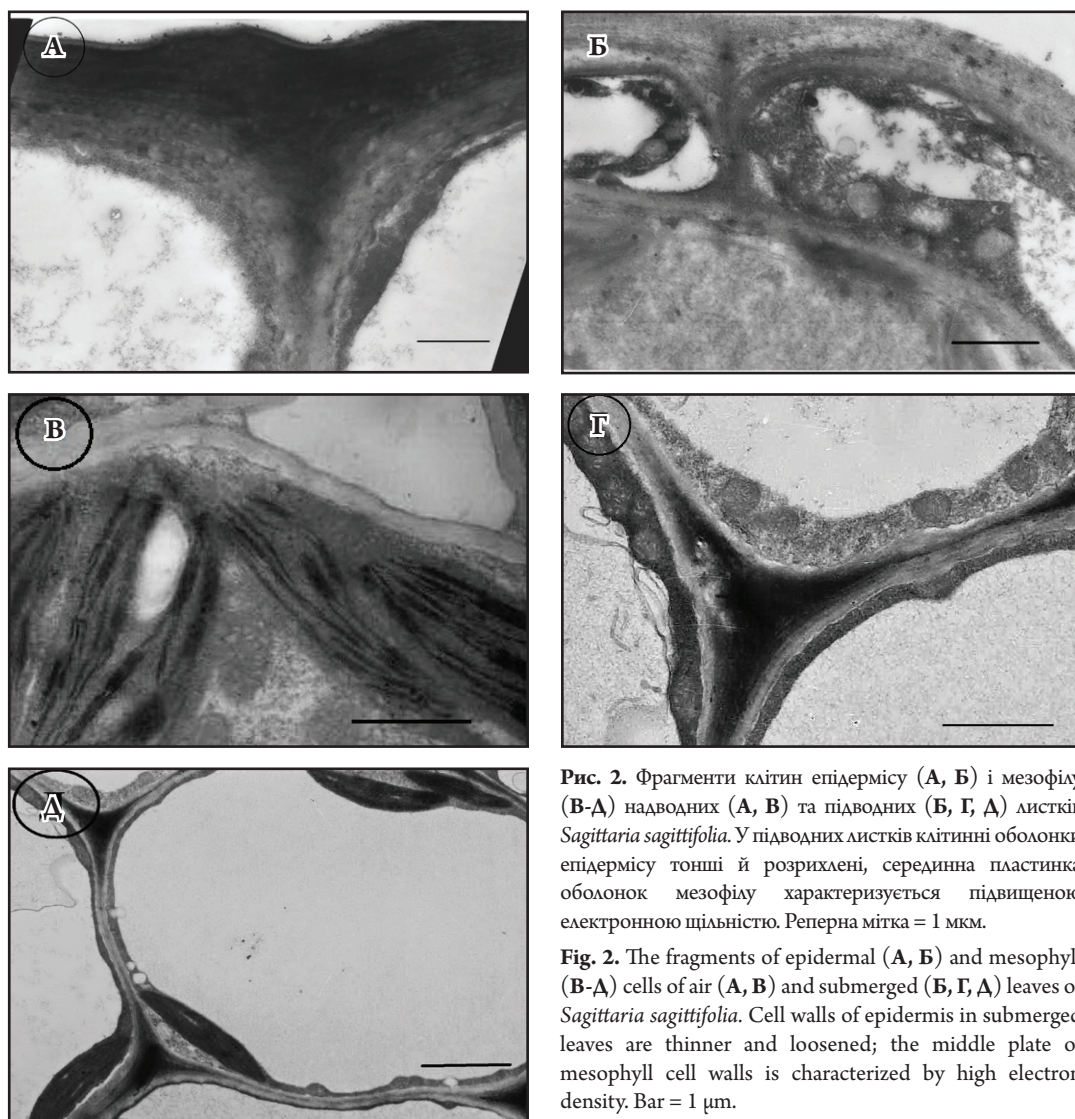
Для рослин *S. sagittifolia* та *T. natans*

характерна виражена гетерофілія (Рис. 1 А-В). Надводні листки *S. sagittifolia* мають стріловидну форму, підводні – лінійну; тоді як плаваючі листки *T. natans* – рівносторонню трикутну форму, а підводні розсічені листки мають частки голкоподібної форми.

### Ультраструктура клітинних оболонок листків *S. sagittifolia*

Дослідження ультраструктури клітинних оболонок епідерми й мезофілу листків показало певні відмінності в структурі клітинних оболонок між надводними та підводними листками.

**Надводні листки.** Зовнішні (периклінальні) оболонки клітин адаксіального епідермісу повітряних листків стрілолиста звичайного мали ширину біля 1,5 мкм, яка сягала 2,5 мкм у зоні антиклінальної оболонки, і характеризувались шаруватістю (Рис. 2 А): зовнішній шар, товщиною до 0,1 мкм, містив електронно щільну кутикулу, середній пектоцелюлозний шар, товщиною 1,2-1,5 мкм характеризувався також електронною щільністю, внутрішній шар (0,2 мкм завтовшки) – зниженою електронною щільністю мікрофібрил целюлози. Клітинні оболонки мезофілу тонкі (до 0,2-0,3 мкм шириною), з типовою пектоцелюлозною структурою (Рис. 2 В).



**Рис. 2.** Фрагменти клітин епідермісу (А, Б) і мезофілу (В-Д) надводних (А, В) та підводних (Б, Г, Д) листків *Sagittaria sagittifolia*. У підводних листків клітинні оболонки епідермісу тонші й розрихлені, серединна пластинка оболонок мезофілу характеризується підвищеною електронною щільністю. Реперна мітка = 1 мкм.

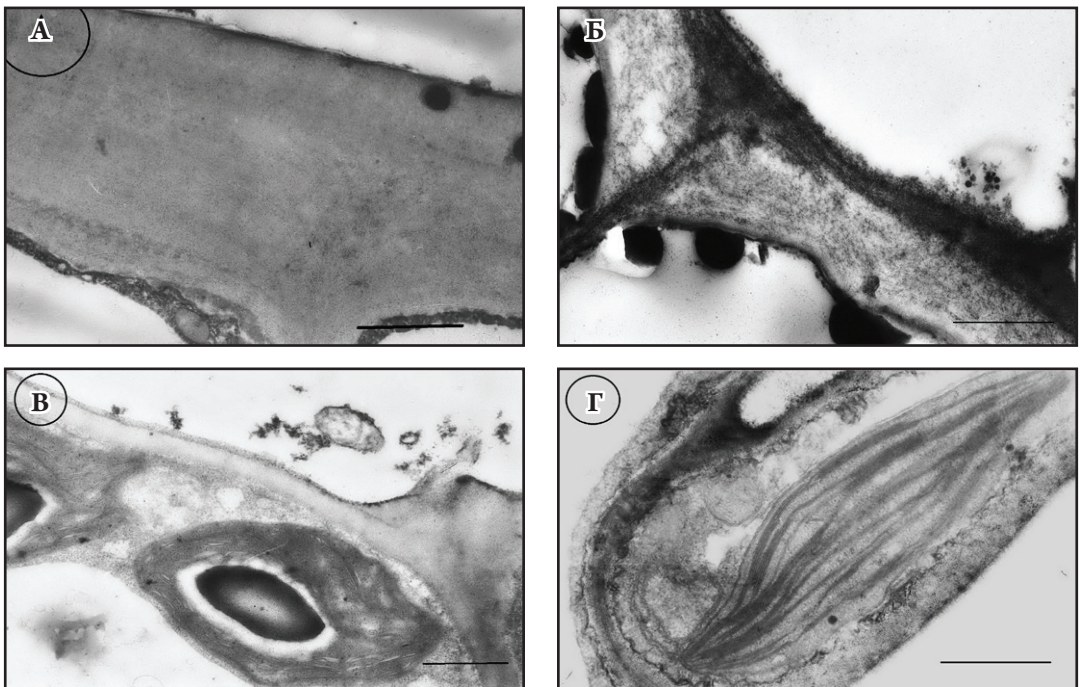
**Fig. 2.** The fragments of epidermal (A, B) and mesophyll (B-D) cells of air (A, B) and submerged (B, G, D) leaves of *Sagittaria sagittifolia*. Cell walls of epidermis in submerged leaves are thinner and loosened; the middle plate of mesophyll cell walls is characterized by high electron density. Bar = 1 μm.

**Підводні листки.** Периклінальні оболонки верхньої та нижньої епідерми підводних листків за структурою відрізнялись від таких у повітряних листків стрілолиста звичайного наступними ознаками: зниженням товщини оболонок удвічі, ослабленням електронної щільності та розпушенням мікрофібрил целюлози (Рис. 2 Б). Тоді, як у клітинних оболонках мезофілу відмічено посилення електронної щільності структур серединної пластинки та оболонки, що контактує з міжклітинним простором (Рис. 2 Г, Д).

### **Ультраструктура клітинних оболонок листків *T. natans***

Дослідження ультраструктури клітинних оболонок епідермісу і мезофілу листків водяного горіха також показало відмінності між структурою оболонок у плаваючих та підводних листків.

**Плаваючі листки.** Зовнішні (периклінальні) оболонки клітин адаксіального епідермісу плаваючих листків водяного горіха були дуже широкі (до 3 мкм), характеризувались шаруватістю (Рис. 3 А). Вони мали зовнішній щільний



**Рис. 3.** Фрагменти клітин епідермісу (А, Б) і мезофілу (В, Г) плаваючих (А, В) та підводних (Б, Г) листків *Trapa natans*. У підводних листків клітинні оболонки епідермісу тонші й розрихлені, серединна пластинка оболонок мезофілу характеризується підвищеною електронною щільністю (Г). Реперна мітка = 1 мкм.

**Fig. 3.** The fragments of epidermal (A, B) and mesophyll (B, G) cells of floating (A, B) and submerged (B, G) leaves of *Trapa natans*. Cell walls of epidermis in submerged leaves are thinner and loosened; the middle plate of mesophyll cell walls is characterized by high electron density (G). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

кутикулярний шар (40 нм товщиною), середній шар (2,2-2,7 мкм завширшки) та внутрішній (0,2-0,3 мкм завширшки) більш електронно прозорий, в якому чітко було видно мікрофібрили целюлози. Клітинні оболонки мезофілу тонкі ( $\approx 0,3$  мкм завширшки), характеризувалися типовою пекто-целюлозною структурою з незначним гранулярним вмістом (Рис. 3 В).

**Підводні листки.** Периклінальні оболонки епідермісу голковидних часток підводних листків за структурою відрізнялись від клітинних оболонок плаваючих листків за наступними ознаками: зниженням товщини в 2,5 рази, ослабленням електронної щільності та значним розпушенням мікрофібрил целюлози (Рис. 3 Б). У клітинних оболонках мезофілу відмічено посилення електронної щільності серединної пластинки (Рис. 3 Г).

#### **Дослідження вмісту полісахаридів клітинних оболонок підводних, надводних і плаваючих *S. sagittifolia* і *T. natans***

Біохімічними методами визначено вміст целюлози, лігніну, геміцелюлоз, пектину та протопектину у плаваючих, повітряних і підводних листках *S. sagittifolia* та *T. natans* у фазі вегетативного росту. Показано, що підводні умови викликають зміни вмісту полісахаридів листків: збільшення удвічі вмісту лігніну, збільшення вмісту геміцелюлоз у 1,1 та 1,4 рази; зменшення вмісту целюлози у 1,1 та 1,3 рази у порівнянні із плаваючими й надводними листками для *T. natans* і *S. sagittifolia*, відповідно (Рис. 4). Подібне підвищення вмісту лігніну та геміцелюлоз раніше було виявлене у підводних стеблах *Ludwigia repens* J.R. Forst. у порівнянні з надводними стеблами (LITTLE 2003). Таким чином, відмінності вмісту геміцелюлоз і

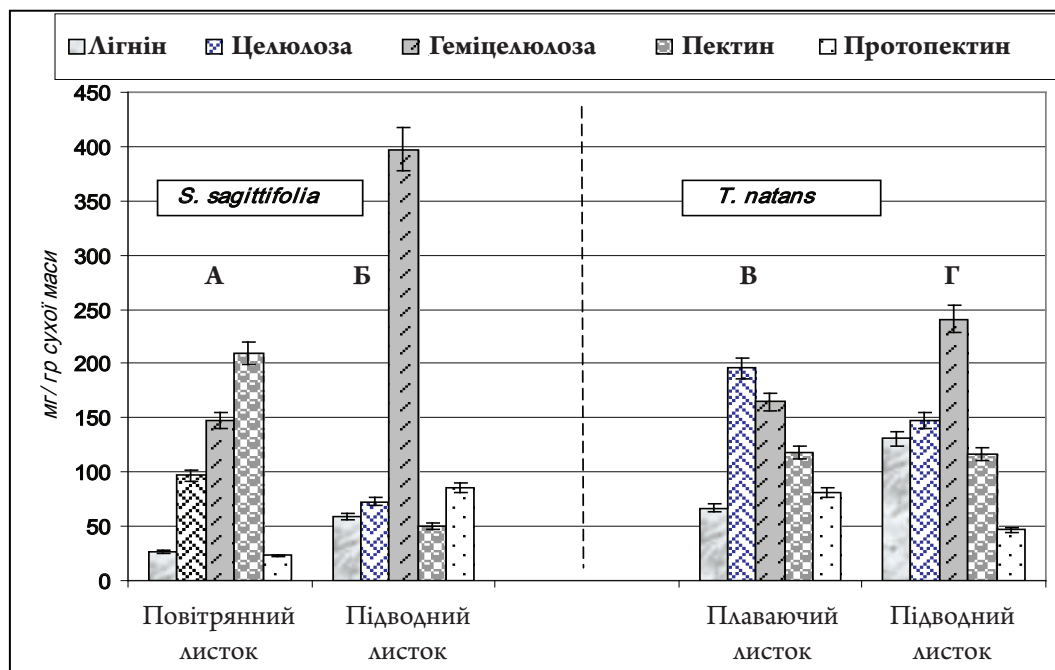


Рис. 4. Вміст полісахаридів у клітинних оболонках повітряних (А) та підводних (Б) листків *Sagittaria sagittifolia*, а також плаваючих (В) та підводних (Г) листків *Trapa natans*.

Fig. 4. The content of polysaccharides in the cell walls of air (A) and submerged (Б) leaves of *Sagittaria sagittifolia*, and floating (В) and submerged (Г) leaves of *Trapa natans*.

целюлози підводних листків *S. sagittifolia* та *T. natans* певним чином узгоджуються із змінами ультраструктури клітинних оболонок (розпушенням та зниженням товщини). Тоді як зміни вмісту пектину й протопектину у досліджуваних видів при затопленні різнилися: у *S. sagittifolia* вміст пектину зменшувався у 4 рази, а у *T. natans* – не змінювався. Вміст протопектину у листках *S. sagittifolia* удвічі збільшувався, у листках *T. natans* – удвічі знижувався. Питання про механізми таких змін вмісту пектинів лишається відкритим.

### Обговорення та висновки

Таким чином, методом трансмісійної електронної мікроскопії нами встановлено суттєві відмінності в ультраструктурі й товщині клітинних оболонок підводних та надводних листків досліджуваних видів гідрофітів. Такі відмінності були тканино-

специфічні: в епідермісі периклінальні оболонки ставали тоншими та розпушеними, тоді як оболонки фотосинтезуючих паренхімних клітин листків, занурених у воду, – ставали електронно щільними. Механізм формування тонких клітинних оболонок у різних тканинах рослин пояснюють змінами тургору клітини та зменшенням активності синтетаз, що беруть участь у синтезі полісахаридів оболонок (COSGROVE 1998). Щодо розпушення клітинних оболонок, то існує багато моделей цього процесу. Першу гіпотезу про кислотну-індукований механізм розпушення було запропоновано Клеландом та Раулем (CLELAND 1983; RAYLE & CLELAND 1992). Пізніше було показано, що гідроліз полісахаридів при розрихленні – це комплексний процес, у якому ферментативний гідроліз полісахаридів матриксу оболонок відбувається за участі ендоглюканаз та експансинів. Останні не гідролізують полісахариди,

а лише індукують розтяг і збільшують пластичність оболонок в залежності від рН апопласту (COSGROVE 1998, 2001). Крім того, ефекторами розпушення оболонок виступають фітогормони. Встановлено, що один із механізмів розпушення клітинних оболонок у стеблах вищих рослин – це участь брасиностероїдів, які регулюючи експресію генів білків розпушення, а саме ксилоглюкан-ендотрансглюкозилаз, діють на транскрипційному рівні (CLOUSE 1997; WADA & KATSUMI 2005).

Відомо, що саме потоншений шар кутикули та наявність пор або розпушень у зовнішніх оболонках епідерми підводних листків сприяє оптимальному транспорту газів та води у листках в умовах затоплення рослин (НЕДУХА 2011). Враховуючи отримані нами дані про відмінності в ультраструктурі клітинних оболонок епідерми занурених листків *T. natans* і *S. sagittifolia*, можна припустити що розпушена структура перикалінальних тонких клітинних оболонок епідермісу підводних листків є наслідком слабого тургору цих клітин, активації гідролаз та експансинів, а також участі брасиностероїдів. Ці структурні пристосування реалізуються для оптимального функціонування транспортних процесів між листком та оточуючим водним середовищем. Їх, очевидно, можна розглядати як адаптаційні ознаки підводних листків до існування у водному середовищі в умовах зміни як вмісту, так і швидкості транспорту розчинених у воді іонів та газів ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ).

Відомо, що лігніфікація клітинних оболонок паренхімних клітин і клітин провідних пучків у мезофітів починається саме по кутах цих клітин та у серединній пластинці, що заповнена пектиновими речовинами. Ці зони починають збагачуватися гідроксифеніловими та гваяциловими одиницями (BOUDET 2001), а також фенолами (кумаровою та феруловою кислотами), які служать якорем для синтезу лігніну (LAI *et al.* 1999). Крім того, методом імунної цитохімії також доведено наявність лігніну у електроннощільних зонах серединної пластинки клітин тютюну (CHABANNES *et al.*

2001). Враховуючи одержані нами дані про більший вміст лігніну в оболонках підводних листків досліджуваних гідрофітів та наявність електронних ущільнень в міжклітинниках і кутах фотосинтезуючих паренхімних клітин підводних листків цих рослин, а також зважаючи на відмічені вище дані літератури, можна зробити припущення, що ущільнення між паренхімними клітинами у підводних листків є наслідком посиленого відкладення лігніну, що також підтверджується і біохімічними даними.

### Використані джерела

- АРАСИМОВИЧ В., ЕРАМКОВ А. 1987.** Определение полисахаридов и лигнина. В кн.: ЕРМАКОВ А. (ред.), Методы биохимического изучения растений: 143–172. Агрпроиздат, Ленинград.
- ДОРОНІН Ю.П. 2000.** Фізика океана. РГМУ, Санкт-Петербург
- НЕДУХА О.М. 2004.** Структурна характеристика та аналіз пігментів водної форми *Sium latifolium* L. *Укр. ботан. журн.* **61**: 74–85.
- НЕДУХА О.М. 2011.** Гетерофілія у рослин. Альтерпрес, Київ.
- ARBER A.R. 2008.** Water plants: A study of aquatic angiosperms. Camb. Univ. Press, Cambridge.
- BOUDET A.-M. 2001.** Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. In: ROSE J.K.C. (ed.), The plant cell wall: 155–182. Cornell Univ. Ithaca, New York. USA.
- CHABANNES M., RUEL K., YOSHINAGA A. et al. 2001.** *In situ* analysis of lignins from tobacco transgenic lines down-regulated for several enzymes of monolignol synthesis reveals a differential impact of transformation on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J.* **28**: 271–282.
- CLELAND R.E. 1983.** The capacity for acid-induced wall loosening as a factor in the control of *Avena coleoptile* cell elongation. *J. Exp. Bot.* **34**: 676–680.
- CLOUSE S.D. 1997.** Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. *Physiol. Plant* **100**: 702–709.
- COSGROVE D.J. 1998.** Molecular regulation of plant cell wall extensibility. *Gravit. Space. Biol. Bull.* **11**: 61–70.
- COSGROVE D. J. 2001.** Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.* **125**: 131–134.
- LAI Y.Z., FUNAOKA M., CHEN H.T. 1999.** Chemical heterogeneity in woody lignins. In: ARGYROPOULOS D.S. (ed.), Advances in lignocellulosics characterization: 43–53. TAPPI Press, Atlanta.

- LITTLE S.T. 2003.** Adaptation and acclimation of populations of *Ludwigia repens* to growth in high- and lower CO<sub>2</sub> springs. PhD Dissertation presented to the graduate school of the University of Florida. Univ. Florida. USA.
- MOMMER L., PONS T.L., WOLKERS-ARTS M. et al. 2005.** Submergence-induced morphological, anatomical, and biochemical responses in a terrestrial species affects gas diffusion resistance and photosynthetic performance. *Plant Physiol.* **139**: 497–508.
- RAYLE D.L., CLELAND R.E. 1992.** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation. *Plant Physiol.* **99**: 1271–1274.
- SMITH F.F., WALKER N.A. 1981.** Photosynthesis by aquatic plants: effects of unstirred layers in relation to assimilation of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and isotopic discrimination. *New Phytol.* **6**: 1017–1027.
- SCHÖNHERR J. 1982.** Resistance of plant surfaces to water loss: transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In: LANGE O.L., NOBEL P.S., OSMOND C.B., ZIEGLER H. (eds), *Physiological plant ecology*: 153–179. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SCHÖNHERR J. 2006.** Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot.* **57**: 2471–2491.
- WADA T., KATSUMI M. 2005.** Brassinolide as a modulator of the activities of cell wall loosening proteins. *Plant Biotech.* **22**: 33–38.

#### STRUCTURAL FEATURES OF THE CELL WALLS IN THE LEAVES OF *SAGITTARIA SAGITIFOLIA* L. AND *TRAPA NATANS* L.

OLENA M. NEDUKHA

**Abstract.** The ultrastructure of the cell walls of *Sagittaria sagittifolia* and *Trapa natans* leaf epidermis and mesophyll was studied under a transmission electron microscope. The structural features of epidermal cell walls of submerged leaves were observed in opposition to cell walls of air and floating leaves. There were observed the decreasing of the thickness of periclinal cell walls in epidermis and loosening inside cellulose microfibrils for submerged leaves. There were also obtained the increasing of hemicelluloses and lignin contents, as well as the decreasing of cellulose content in submerged leaves. These data are discussed in context of the apoplast transport in submerged leaves.

**Key words:** *Sagittaria sagittifolia*, *Trapa natans*, epidermis, cell walls, leaf

M.G. Kholodny Institute of Botany NAN Ukraine, 2 Tereshchenkivska str., Kyiv, 01004, Ukraine; o.nedukha@hotmail.com