

УДК 581.4:581.45

АНАТОМІЧНА СТРУКТУРА ПІДВОДНИХ ОРГАНІВ *TRAPA NATANS* L. У ЗВ'ЯЗКУ З ЕКОЛОГІЄЮ ВИДУ

ОЛЕНА М. НЕДУХА

Анотація. Представлені результати анатомічного дослідження вегетативних підводних органів повітряно-водного виду *Trapa natans* (водяного горіха), що зростає на березі Русанівського каналу (лівий берег р. Дніпро, м. Київ) у фазі бутонізації. Виявлено, що підводні корені, стебло та підводні листки досліджуваного виду характеризуються мікроструктурою, яка властива підводним органам гідрофітів. Найбільш яскраво виражені адаптаційні ознаки до підводного існування у додаткових коренів, зокрема, наявність у первинній корі хлоропластів і повітряних порожнин (розвиненої аеренхіми). Підводні фотосинтезуючі додаткові корені відрізняються від підводних розсічених листків за анатомічними ознаками, кількістю хлоропластів у клітинах та інтенсивністю автофлуоресценції хлорофілу.

Ключові слова: *Trapa natans*, підводні фотосинтезуючі корені, підводні фотосинтезуючі листки, стебло, анатомічна структура, автофлуоресценція хлорофілу

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01601, Україна;
o.nedukha@hotmail.com

Вступ

Вивчення морфо-анатомічних ознак повітряно-водних рослин має значення як для систематики, так і для дослідження адаптації рослин до затоплення. Відомо, що для багатьох видів повітряно-водних рослин характерна гетерофілія, яка проявляється у анатомічних відмінностях надводних і підводних листків. Гетерофілія допомагає органам, зануреним у воду, пристосуватися до зниження освітленості, зміни складу світла, вмісту CO₂ та O₂ в оточуючому середовищі, а також до змін, пов'язаних зі зниженням дихання та ослабленим вуглецевим живленням (ARMSTRONG *et al.* 1994; ARBER 2008; НЕДУХА 2011).

Дані щодо ідентифікації підводних фотосинтезуючих органів водяного горіха (*Trapa natans* L.) на сьогодні протилежні. Ряд авторів називають розсічені зелені пірчасті органи, що відходять від підводного стебла, фотосинтезуючими коренями (SCULTHORPE 1971; ISHIMARU *et al.* 1996; ARS 2004). Інші автори стверджують, що це підводні листки (BITONTI *et al.* 1996; BERCU 2004; ПІРІВОН *et al.* 2010; ШАЛАВН

et al. 2012). Існує і третя точка зору, згідно з якою пірчасті зелені органи водяного горіха – це прилистки, які мають листкове походження, оскільки вони починають формуватися на місці перших лінійних листків, що опадають (ВАСИЛЬЄВ 1978). Тому метою нашої роботи було порівняльне дослідження анатомії і наявності хлоропластів у підводних органах *T. natans* у фазі бутонізації, коли у цієї рослини починають формуватися на підводному стеблі додаткові корені.

Матеріали і методи досліджень

Об'єкт дослідження – підводні додаткові корені, підводні листки та стебла водяного горіха (*T. natans*), що зростав на глибині до 80 см на березі Русанівського каналу (лівий берег р. Дніпро, м. Київ). Підводні корені, підводні листки та стебла збирали у фазі бутонізації (в першій декаді липня). Для світлової мікроскопії фрагменти серединної частини підводних органів відбирали із семи рослин. Матеріал фіксували одразу на березі сумішшю 5% розчину параформальдегіду та 2% розчину глютарового альдегіду (1:1) на 0,5 М фосфатному буфері, рН 7,2.

Тривалість фіксації становила близько 24 годин. Фіксований матеріал у лабораторних умовах промивали буфером, обезводнювали етанолом і ацетоном, заливали в суміш епон/аралдит за загально прийнятою методикою. Напівтонкі зрізи (до 12 мкм товщиною), підфарбовували шифом та розчином сафраніну за загальноприйнятою методикою (Фурст 1979).

Препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопа CarlZeiss Axioscope (Німеччина). Автофлуоресценцію хлорофілу в підводних органах водяного горіха досліджували за допомогою лазерного скануючого мікроскопа LSM 5 Pascal (Німеччина), використовуючи лазер з довжиною хвилі збудження 520 нм, та хвилі емісії – 662 нм.

Відносну інтенсивність автофлуоресценції хлорофілу визначали за допомогою програми Pascal на LSM. Для ідентифікації досліджуваних тканин зразки підводних органів, підфарбовували 0,001% розчином калькофлуора або 0,05% розчином анілінового синього згідно протоколу (Нертн 1980; CURRIER & SHIN 1968), а потім вивчали автофлуоресценцію хлорофілу. Для дослідження використовували серединну частину підводних коренів, серединну частину лінійних часток листків та частину стебла на 1 см нижче третього міжвузля. Лінійні розміри клітин підводних органів водяного горіха визначали у 30–40 клітинах кожного типу тканини в чотирьох зразках. Отримані дані обробляли статистично, використовуючи програму BIO-8.

Результати та їх обговорення

Рослини водяного горіха за своєю екологією є однорічними гідрофітами. Повний цикл онтогенезу становить 2,5-3

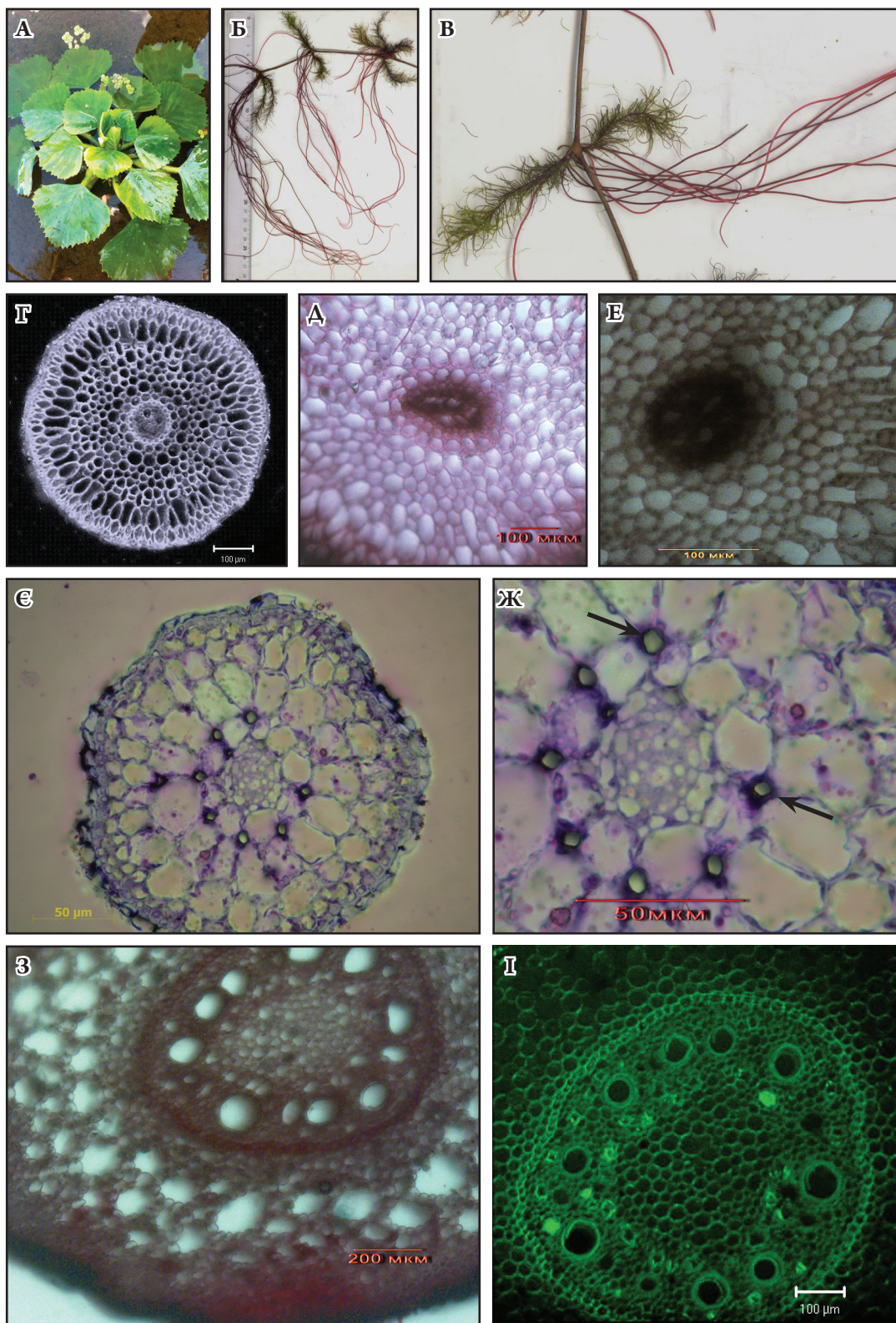
місяці. На початку фази бутонізації/цвітіння кожна особина *T. natans* характеризується наявністю підводного нерозгалуженого стебла, що простягається від пророслого плоду (горіха) до плаваючих листків, які формують розетку на поверхні води (Рис. 1 А). Стебло поділене на сегменти завдовжки від 60 до 90 мм. Від стебла поблизу плоду, який занурений у ґрунт, відходять кілька первинних коротких, мичкуватих, бурих за кольором, коренів, які також занурені у ґрунт. В основі кожного сегмента стебла поряд із підводними листками з пазушних бруньок у фазі бутонізації формуються додаткові мичкуваті корені, рожеві за кольором, завдовжки від 7,5 см до 31 см. Від кожного стеблового сегменту (міжвузля) відходить від 7 до 12 коренів та 2-4 підводні розсічені листки, розміщені супротивно (Рис. 1 Б, В).

Світлова мікроскопія

Підводні додаткові корені. На поперечному перерізі корені майже округлої форми, діаметром від 410 до 650 мкм, кореневі волоски відсутні. Корені вкриті одношаровою епідермою, що складається із злегка витягнутих, радіально розміщених клітин (Рис. 1 Г), з середніми розмірами $10 \pm 2,1 \times 7 \pm 1,4$ мкм. Під епідермою розміщується шар екзодерми, розмір клітин якої становить $40 \pm 2,7 \times 21 \pm 1,9$ мкм. Первинна кора налічує 8-10 шарів клітин. Форма клітин від периферії до центру змінюється від овальної витягнутої до округлої або шестикутної (Рис. 1 Д). Зовнішні шари кори додаткових коренів утворюють радіальну аеренхіму, кількість шарів якої коливається від 2 до 5 у різних коренів. Внутрішній шар кори формує товстостінну ендодерму, за якою розміщується шар перициклу (Рис. 1 Д, Е), складений з майже

Рис. 1. Загальний вигляд плаваючих листків (А), підводних додаткових коренів, розсічених листків і стебла (Б, В) *Trapa natans* у фазі бутонізації-цвітіння. Поперечні зрізи кореня (Г-Е), листкового сегменту (Є, Ж) та стебла (З, І). На Рис. Ж стрілками вказані міжклітинники.

Fig. 1. General view of floating leaves (A), submerged secondary roots, dissected leaves and stem (B, B) of *Trapa natans* in budding-flowering stage. The cross sections of root (Г, Е), leaflet (Є, Ж) and stem (З, І). On Fig. Ж the air spaces are indicated by the arrows.



округлих клітин з потовщеними оболонками і діаметром $15 \pm 1,7$ мкм. Центральний циліндр містить дрібні клітини флоєми, чотири пучки метаксилеми діаметром біля $20 \pm 2,1$ мкм, з 4-6 судинами кожен (Рис. 1 Е).

Підводні листки. Розсічені, пірчасті, яскраво-зелені, складаються із голчастих сегментів завдовжки до 20 мм, діаметр яких коливається від 170 до 320 мкм, продихи відсутні. На поперечному перерізі листкові сегменти округлих обрисів; клітини епідерми щільно прилягають одна до одної, невеликого розміру ($10 \pm 0,7 \times 6 \pm 0,7$ мкм). Під епідермою розміщується фотосинтезуюча паренхіма, кількість шарів якої коливається від 4 до 7; шари паренхіми розміщуються концентрично, рівномірно та щільно (Рис. 1 Є). У більшості листкових сегментів повітряні порожнини відсутні, зрідка вони виявляються лише як розширені міжклітинники внутрішньої паренхіми (Рис. 1 Ж). Найбільші за розмірами клітини ($43 \pm 2,7 \times 33 \pm 2,9$ мкм) містяться у середньому шарі паренхіми. У центрі листкового сегмента розташовується єдиний провідний пучок з судиною і клітинами флоєми.

Підводне стебло. На поперечному перерізі стебло злегка овальної форми, середній лінійний розмір по довгій осі коливається від 900 ± 87 мкм до 1490 ± 103 мкм, а по короткій осі становить 890 ± 93 мкм. Епідерма складається із дрібних клітин із потовщеними клітинними оболонками. Під епідермою розміщується первинна кора, у якій ззовні розміщується багат шарова щільна коленхіма із дрібними клітинами (Рис. 1 З). Первинна кора містить 8-9 шарів клітин, зовнішні з яких формують аеренхіму. За аеренхімою розміщуються 3-4 шари дрібних паренхімних клітин та один шар ендодерми з товстими клітинними оболонками. Ксилема та флоєма центрального циліндра розміщуються концентрично (Рис. 1 І).

Флуоресцентна мікроскопія

Лазерне конфокально-мікроскопічне дослідження додаткових коренів водяного горіха показало наявність хлоропластів у клітинах кори. Автофлуоресценція

хлорофілу була яскраво червоного кольору (Рис. 2 А). За вмістом хлоропластів клітини кори коренів різнилися. У п'яти з семи досліджених коренів хлоропласти виявлялися у клітинах кори (Рис. 2 А). Середня кількість хлоропластів на одну клітину кори таких коренів становить $2,9 \pm 0,8$. Тоді як у інших коренів окремі хлоропласти виявлялися лише у зовнішніх клітинах кори (Рис. 2 Б), а клітини внутрішніх шарів кори не містили хлоропластів, або ж окремі клітини таких шарів характеризувалися суцільною автофлуоресценцією хлорофілу, в якій окремі хлоропласти не розрізнялися (Рис. 2 Б). Середня інтенсивність флуоресценції хлорофілу у корі коренів становила $61 \pm 5,9$ умовних одиниць, тоді як абсолютне значення інтенсивності автофлуоресценції хлорофілу (червона частина діаграми) становила 127916 пікселів (Рис. 2 Д).

Флуоресцентна мікроскопія розсічених підводних листків водяного горіха показала, що всі клітини фотосинтезуючої паренхіми та клітини епідерми містять хлоропласти (Рис. 2 В, Г). Найбільші за розміром клітини центрального шару паренхіми містять в середньому $12 \pm 1,3$ хлоропластів. Середня інтенсивність флуоресценції хлорофілу у підводних листках становила $105 \pm 7,9$ умовних одиниць; абсолютне значення інтенсивності автофлуоресценції хлорофілу (червона частина діаграми) було вищим, ніж у коренях, і становило 181653 пікселів (Рис. 2 Е).

Середня інтенсивність автофлуоресценції хлорофілу в клітинах кори стебла становила $45 \pm 3,9$ умовних одиниць, а абсолютне значення інтенсивності автофлуоресценції хлорофілу – 17717 пікселів.

Таким чином, анатомічні дослідження підводних органів водяного горіха у фазі бутонізації показали формування додаткових фотосинтезуючих коренів, що розвиваються у міжвузлі стебла поряд із підводними розсіченими листками, які деякі автори називають коренями (SCULTHORPE 1971; ISHIMARU *et al.* 1996). Попередні структурні дослідження вегетативних органів цього виду у фазі вегетативного росту не виявили наявності додаткових фотосинтезуючих

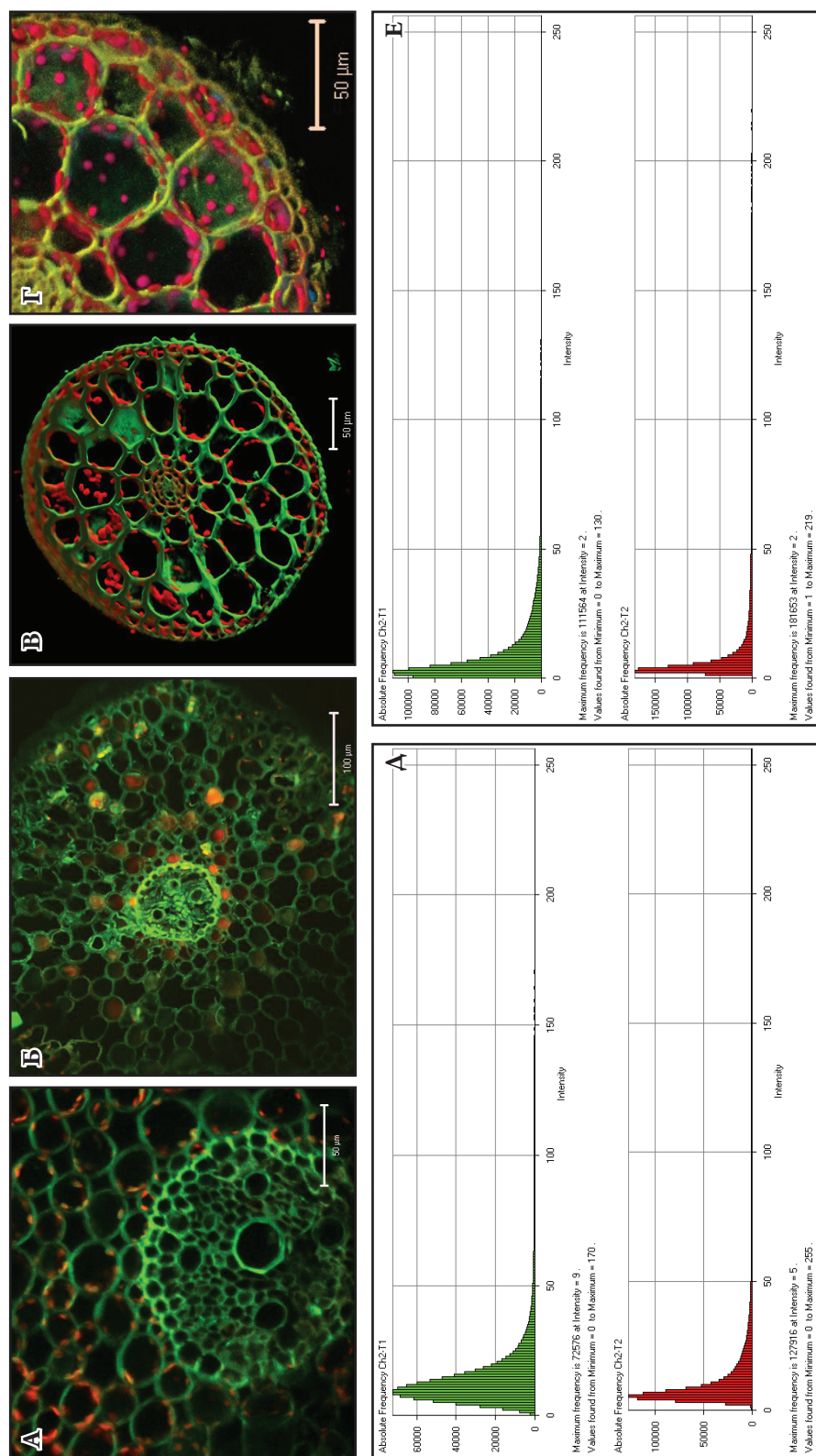


Рис. 2. Мікрофотографії автофлуоресценції хлорофілу (позначено червоним кольором) у клітинах кори підводних додаткових коренів (А, Б), клітинах епідермісу і фотосинтезуючої паренхіми підводних розсічених листків (Б, Г) *Trapa natans* після обробки аніліновим синім (А, Б) або калкофлором (Б, Г). На Рис. А та Б – абсолютна частота пікселів для хлорофілу (на нижній червоній частині графіків) та для калози й целюлози (зелена частина графіків) у коренях (А) та листках (Б).
Fig. 2. Microphotographs of chlorophyll auto fluorescence (signed by red) in *Trapa natans* core cells of submerged secondary roots (А, Б) and epidermal and parenchyma cells of submerged dissected leaves (Б, Г) after staining by aniline blue (А, Б) or calcofluor (Б, Г). On Figs. А and Б – the absolute frequency of pixels for chlorophyll (lower red graph), callose and cellulose (upper green graphs) in root (А) and leaf (Б).

коренів на підводному стеблі (НЕДУХА І КОТЕНКО 2012: див. рис. 1 В-Д). Встановлено, що додаткові фотосинтезуючі корені водяного горіха, який зростав у Русанівському каналі, починають утворюватися лише на початку фази бутонізації і функціонують доти, поки не досягнуть плоди (до середини серпня).

Анатомічні дослідження структури додаткових коренів *T. natans* показали наявність добре розвинутої аеренхіми, яка, як відомо, функціонує для акумуляції та транспорту газів, у першу чергу, кисню та вуглекислого газу, і є відповіддю затоплених органів на умови гіпоксії, які виникають при зростанні рослини у воді (НЕ *et al.* 1999; VARTARETIAN & JACKSON 1997).

Враховуючи отримані нами дані, про наявність хлоропластів у клітинах кори, яка межує із аеренхімою підводних коренів водяного горіха, а також принципозначення функціонування хлоропластів у забезпеченні рослини як синтезом вуглеводів, так і киснем (МЕДВЕДЕВ 2004), можна припустити, що у фазі бутонізації-цвітіння фотосинтезуючі клітини додаткових коренів *T. natans* беруть активну участь у подоланні надмірної гіпоксії. Окрім цього, можна припустити, що кисень, який утворюється в клітинах кори додаткових коренів водяного горіха, очевидно, транспортується з паренхімних фотосинтезуючих клітин як в аеренхіму, так і на поверхню епідермальних клітин підводних коренів, де, як відомо, відбувається окислення іонів металів (до редукованих форм), що осідають на поверхню підводних коренів і перешкоджають поглинанню та транспорту поживних речовин з оточуючого водного середовища в корінь (CRAWFORD 1983; ZIMMERMANN 1993).

Анатомічна структура сегментів розсічених підводних листків *T. natans* у фазі бутонізації не відрізняється від структури таких листків у фазі вегетативного росту рослини (НЕДУХА І КОТЕНКО 2012), і характеризується типовими ознаками, властивими підводним листкам як справжніх гідрофітів (*Potamogeton pectinatus* L. та *Myriophyllum spicatum* L.), так і повітряно-водних рослин (*Sagittaria sagittifolia* L., та *Sium*

latifolium L.). Зокрема відсутністю продихів, округлою формою на поперечних зрізах, наявністю недиференційованого мезофілу (фотосинтезуючої паренхіми), наявністю великих хлоропластів як в епідермі, так і у клітинах фотосинтезуючої паренхіми, а також слабо розвиненою провідною системою (BERCU & FAGARAS 2002; BERCU 2004, 2010; РОНЖИНА И ПЬЯНКОВ 2001; НЕДУХА 2011). Окрім того, у підводних листках водяного горіха відсутня екзодерма та перицикл, які характерні тільки для коренів (ЕЗАУ 1980). Необхідно також відмітити, що середня кількість хлоропластів на одну клітину паренхіми підводного листка майже у чотири рази більша, ніж на одну клітину кори підводного кореня водяного горіха. На основі отриманих нами результатів та вище зазначених даних літератури, ми можемо зробити висновок, що розсічені зелені підводні органи водяного горіха є листками, а рожеві додаткові корені – фотосинтезуючими підводними коренями, що формуються на початку фази бутонізації і функціонують для подолання гіпоксії.

Структура підводного стебла водяного горіха, як і структура додаткових фотосинтезуючих коренів, характеризується наявністю великих повітряних порожнин та невеликими хлоропластами в клітинах кори. Подібні ознаки для стебел та черешків листків раніше були описані для водних рослин *Barcoba caroliniana* (Walt.) Robins., *Moniera ampexicaulis* Michx. та *Obolari caroliniana* (BERCU 2010).

Висновки

1. Дослідження анатомічної структури допоміжних коренів водяного горіха показує, що корені характеризуються типовою первинною структурою. Кора добре розвинена, містить великі повітряні порожнини, у клітинах кори наявні хлоропласти. Центральний циліндр має будову, типову для коренів дводольних.

2. Мезофіл підводних розсічених листків є гомогенним із великою кількістю хлоропластів, продихи відсутні.

3. Підводне стебло має первинну анатомічну структуру, типову для водних рослин, характеризується наявністю в корі повітряних порожнин, а у центральному циліндрі – концентрично розміщених елементів ксилеми й флоєми.

Використані джерела

- ВАСИЛЬВ В.Н.** 1978. О природе подводных органов у представителей рода *Trapa* L. (Trapaceae). *Ботан. журн.* **63**: 1515–1518.
- ЕЗАУ К.** 1980. *Анатомия растений*. Кн. 2. Мир, Москва.
- МЕДВЕДЕВ С.С.** 2004. *Физиология растений*. Изд. Санкт-Петербургского ун-та, Санкт-Петербург.
- НЕДУХА О.М.** 2011. Гетерофілія у рослин. Альтерпрес, Київ.
- НЕДУХА О.М., КОТЕНКО Т.Б.** 2012. Гетерофілія у *Trapa natans* L. Морфолого-анатомічна будова листків. *Mod. Phytomorphol.* **2**: 29–33.
- РОНЖИНА Д.А., ПЬЯНКОВ В.И.** 2001. Структура фотосинтетического аппарата листа пресноводных гидрофитов. II. Количественная характеристика мезофила листа и функциональная активность листьев с разной степенью погружения. *Физиология растений* **48**: 836–845.
- ФУРСТ Г.** 1979. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. Наука, Москва.
- ARBER A.** 2008. *Water plants. A study of aquatic angiosperms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ARMSTRONG W., BRANDE R., JACKSON M.B.** 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Neerland.* **43**: 307–358.
- ARS** 2004. Agricultural Research Service. Systematic botany and mycology laboratory. United States, NY. <http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>
- BERCU R.** 2004. Histoanatomy of the leaves of *Trapa natans* (Trapaceae). *Phytologia Balcanica* **10**: 51–55.
- BERCU R.** 2010. Histoanatomy of *Barcopa carolina* (Walt) Robins. (Scrophulariaceae). *Biologie (Universitatea "Vasile Alecsandri" din Bacău)* **18**: 99–102.
- BERCU R., FAGARAS M.** 2002. Anatomical features of the root, stem and leaf blade of *Potamogeton pectinatus* L. and *Vallisneria spiralis* L. *Conf. Bot. Univ "Babes-Bolyai" Cluj-Napoca* **37**: 41–42.
- BITONTI M., COZZA R., WANG G., RUFFINI-CASTIGLIONE M., MAZZUCA S., CASTIGLIONE S., SALA F., INNOCENTI A.M.** 1996. Nuclear and genomic changes in floating and submerged buds and leaves of heterophyllous water chestnut (*Trapa natans*). *Physiol. Plantarum* **97**: 21–27.
- CRAWFORD R.M.M.** 1983. Root survival in flooded soils. In: GORE A.J.P. (ed.), *Ecosystems of the world, 4A, Mires: swamp, bog, fen and moor*: 257–283. Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam.
- CURRIER H.B., SHIN C.Y.** 1968. Sieve tubes and callose in *Eloдея* leaves. *Amer. J. Bot.* **55**: 145–152.
- HE J.B., BOGEMANN G.M., VAN DE STEEG H.G., RIJNDERS J.G.H.M.** 1999. Survival tactics of *Ranunculus* species in river flood plants. *Oecologia* **118**: 1–8.
- HERTH W.** 1980. Calcofluor white and Congo-red inhibit chitin microfibril assembly of *Poterochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *J. Cell Biology* **84**: 642–658.
- ISHIMARU K., KUBOTA F., SAITOU K, NAKAYAMA M.** 1996. Photosynthetic response and carboxylation activity of enzymes in leaves and roots of water chestnut, *Trapa bispinosa* Roxb. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* **41**: 57–65.
- PIEROBON E., BOLPAGNI R., BARTOLI M., VIAROLI P.** 2010. Net primary production and seasonal CO₂ and CH₄ fluxes in a *Trapa natans* L. meadow. *J. Limnol.* **69**: 225–234.
- SCULTHORPE C.D.** 1971. *The biology of aquatic vascular plants*. Edward Arnold, London.
- SHALABH B., AKASH J., CHAUDHARY J.** 2012. *Trapa natans* (water chestnut): an overview. *Int. Res. J. Pharm.* **3**: 31–33.
- VARTAPETIAN B., JACKSON M.B.** 1997. Plant adaptation to anaerobic stress. *Ann. Bot.* **79**: 3–20.
- ZIMMERMANN J.L.** 1993. *Cheyenne bottoms. Wetland in Jeopardy*. University Press of Kansas, Kansas.

ANATOMICAL STRUCTURE OF TRAPA NATANS L. SUBMERGED ORGANS IN CONTEXT OF THE SPECIES ECOLOGY

OLENA M. NEDUKHA

Abstract. The results of anatomical study of submerged organs of *Trapa natans* (water chestnut) in budding-flowering stage are presented. The plants were collected along the shore of the Rusanivsky channel (left shore of Dnepr River,

in Kiev). The light and laser scanning confocal microscopy were used. Anatomical structure of the submerged secondary roots, the submerged dissected leaves and stem had the signs that are typical for submerged organs of some hydrophytes. But, the roots are characterized by the peculiarity, they were photosynthesizing. Chloroplasts are revealed in root core cells. The middle number of chloroplasts in one parenchyma cell of submerged leaf was four times more than in one core cell of root. The fluorescence intensity of leaf chloroplasts was also more than that in root or stem chloroplasts. The very developed aerenchyma was characterized for roots and submerged stem in comparison with the submerged dissected leaves, in which an aerenchyma was weak developed and it was presented by very small air space between the cells of inner layer in parenchyma.

Key words: *Trapa natans*, submerged photosynthetic roots, dissected submerged leaves, stem, anatomical structure, chlorophyll auto fluorescence

M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS Ukraine, Tereshchenkivska str. 2, 01601 Kyiv, Ukraine; o.nedukha@hotmail.com