УКРАЇНСЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ ЖУРНАЛ

О.Є. СМІРНОВ, А.М. КОСЯН, О.І. КОСИК, Н.Ю. ТАРАН
ННЦ «Інститут біології» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна
plantaphys@gmail.com

МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ *FAGOPYRUM ESCULENTUM* В УМОВАХ АЛЮМОКИСЛОГО СТРЕСУ

К л ю ч о в і с л о в а: Fagopyrum esculentum, *морфометричний аналіз, водний статус, алюмокислий стрес, адаптація, алюморезистентність*

Фітоморфометрію визначають як розділ ботаніки, що вивчає форму й розміри рослин кількісними методами. За структурно-морфометричного підходу в ботаніці, фізіології та екології рослин будь-яка ознака в її кількісному вираженні виступає як параметр (показник), а стан рослини або її окремої частини можна інтерпретувати за набором таких параметрів (Злобин и др., 2009). За розміром, як базисним поняттям морфометрії, можна визначити тривалість життя, роль виду в харчових ланцюгах, у біоценозі, системний вплив навколишнього середовища, адаптивний потенціал рослини (Marba et al., 2007).

Зміна морфометричних показників є зовнішнім проявом інтегрального впливу навколишнього середовища на рослину (Захаров и др., 2000). Тому визначення набору необхідних морфометричних показників є найбільш відповідальним і критичним етапом у будь-якому ботанічному чи фізіологічному дослідженні в цьому напрямку. Цей набір має відповідати життєвій формі та віковим характеристикам рослини, охоплювати найважливіші ознаки, які визначають її структурний і функціональний статус (Злобин и др., 2009), особливо за умов адаптації до дії стресових чинників: посухи, низьких температур, УФ-випромінювання, токсичних концентрацій важких металів (Lomax et al., 2009).

Важливим фізіологічним показником адаптивного потенціалу рослини щодо екстремальних умов зростання є водний статус тканин. Підтримання рослиною водного балансу на клітинному і тканинному рівнях — необхідна умова не тільки нормального функціонування, а й стійкості за дії несприятливих чинників (Chaves et al., 2003), одним з яких є фітотоксичність алюмінію (Özyiğit, Akinci, 2009).

© О.Є. СМІРНОВ, А.М. КОСЯН, О.І. КОСИК, Н.Ю. ТАРАН, 2014

Таблиця 1. **Морфологічні показники *Fagopyrum esculentum* за дії алюмокислого стресу (M±m), n=30**

Частина рослини	Морфологічні показники				
	сира біомаса, мг		довжина, см		індекс толерантності
	контроль	Al	контроль	Al	
Корінь	86,3±4,2	84±4,6	12,93±0,16	10,24±0,42*	0,79
Пагін	103,2±6,3	99,5±6,2	10,21±0,33	8,43±0,27*	0,82

П р и м і т к а: * — різниця порівняно з контролем статистично достовірна за $p \leq 0,05$.

Токсична дія алюмінію (Al) — визначальний едафічний фактор для формування врожаю сільськогосподарських культур на кислих ґрунтах, площа яких, згідно з паспортизацією земельних угідь України, постійно зростає (Греков, Панасенко, 2009). Першими наочними та швидкими проявами алюмінієвої фітотоксичності є зміна морфопараметрів — гальмування розвитку кореневої системи, зниження загальної фітомаси, а також зменшення водонасиченості тканин як підземної, так і надземної частин рослин (Pompelli et al., 2010).

Тому метою нашої роботи було проведення структурно-морфометричного аналізу та визначення водного статусу рослин гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum* Moench) за дії алюмінію — як алюморезистентної культури та рослини-акумулятора алюмінію (Shen et al., 2006) в умовах алюмокислого стресу.

Матеріали та методи досліджень

Матеріалом для досліджень стали рослини гречки звичайної (*Fagopyrum esculentum*). Насіння пророщували в чашках Петрі на змоченому дистильованою водою фільтрувальному папері за 25° С. На другу добу пророщене насіння пересаджували в ємності (300 мл) зі стерилізованим піском та переносили в контрольовані умови: температура + 25°С, фотоперіод — 16 годин, щільність квантів світлового потоку — близько 80 мкмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$. Рослини підживлювали 50 % розчином Кнопа, який вносили по 200 мл на кожну ємність. Алюмокисле навантаження моделювали, додаючи до піщаної культури алюміній концентрацією 50 мкМ ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$) на сьому добу росту проростків, причому зі складу розчину, для уникнення осадоутворення, вилучали фосфор та знижували рівень pH до 4,5. Для підтримання кислотності середовища розчин щодня оновлювали (Zheng et al., 1998).

Досліджували морфологічні параметри, довжину підземної та надземної частин, сиру фітомасу, індекси толерантності (Hede et al., 2001). Показники водного статусу рослин, відносної тургоресцентності тканин (Паршикова, 2010), довжини і ширини продихів, загальної площі продихів, ширини продихової апертури (Orcen et al., 2013) аналізували на десяту добу від початку внесення алюмінію. Контролем слугували рослини, вирощені на 50 % розчині Кнопа. Продихи епідерми справжніх листків (адаксіальна й абаксіальна поверхні) досліджували методом відбитків (Elagoz et al., 2006) за допомогою світлового мікроскопа Bresser LCD.

Статистичну обробку результатів здійснювали шляхом дисперсійного однофакторного аналізу з використанням t-критерію Стьюдента за $p \leq 0,05$ і програми «Microsoft Excel 2010».

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз отриманих морфологічних параметрів дає можливість оцінити вплив фітотоксиканта алюмінію на рослини гречки звичайної. У ході досліджень виявлено, що додавання 50 мкМ алюмінію до живильного середовища вплинуло на лінійні розміри підземної та надземної частин рослин (табл. 1).

Обробка рослин алюмінієм спричинила зменшення довжини коренів на 21 %, пагонів — на 18 %. В умовах фітотоксичності ґрунту прийнято розраховувати індекс толерантності рослин за зміною лінійних розмірів їх підземної та надземної частин. Індекс толерантності обчислювали як відношення середньої довжини коренів особин, які росли на середовищі з алюмінієм, до середньої довжини коренів контрольних рослин. Цей показник використовують для експрес-аналізу алюморезистентних культур (Hede et al., 2001). Наші дослідження показали, що індекс толерантності, розрахований для кореня, — 0,79; для пагона він становив 0,82. Ріст є інтегральним показником фізіологічного стану рослин, тому інгібування ростових процесів виступає ознакою стресового стану. За алюмінієвої токсичності ріст клітин кореня розтягненням припиняється вже протягом хвилини експозиції рослин у середовищі з металом, поділ клітин — через 6—24 години (Кошкин, 2010). Розраховані нами

індекси толерантності і спостережуване незначне інгібування росту кореня та пагона рослин вказують на високий рівень алюморезистентності гречки звичайної. Дослідження цих показників на інших культурах показало сильний рістінгібувальний ефект алюмінію концентрацією 50 мкМ: довжина коренів дослідних рослин в алюмочутливого сорту пшениці (*Triticum aestivum* L. cv Scout *66*) знижувалася на 65 %. Ефекти затримки росту кореневої системи в межах 25 – 50 % зафіксовані в двох сортів ріпаку (*Brassica napus* L. cvs 94008 та H166), двох сортів вівса (*Avena sativa* L. cvs Tochiyutaka і Heoats) та алюмотолерантного сорту пшениці (cv Atlas 66) (Zheng et al., 1998).

Порівняння маси коренів та пагонів дослідних рослин з контрольними показниками засвідчило, що додавання до середовища алюмінію спричинює зниження фітомаси, але вплив металу на рослини не є статистично достовірним (табл. 1). Відсутність достовірних змін фітомаси надземної та підземної частин із зменшенням їхніх лінійних розмірів може вказувати на активацію компенсаторних адаптивних механізмів в умовах алюмінієвої токсичності, тому наступним етапом досліджень було з'ясування впливу металу на водний статус рослин.

Здатність рослин підтримувати достатній рівень водонасиченості тканин — одна з основних умов виживання, оскільки більшість з них не можуть забезпечувати нормальної життєдіяльності в умовах дегідратації (Жук, 2010). Наші дослідження вказують на незначне зниження рівня відносної тургоресцентності тканин як кореня, так і пагона (рис. 1).

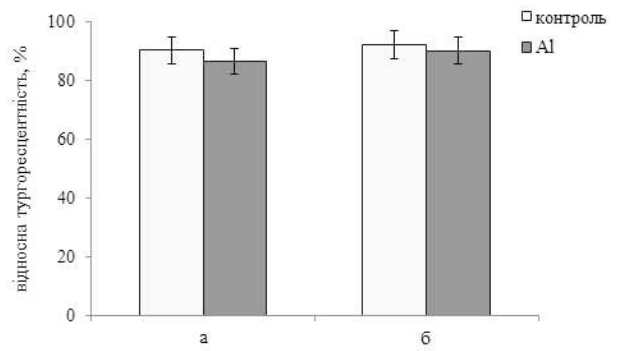

Рис. 1. Відносна тургоресцентність тканин проростків *Fagopyrum esculentum* в умовах алюмінієвої токсичності: *а* — корені; *б* — пагони

Fig. 1. Relative water content in tissues of *Fagopyrum esculentum* seedlings under aluminium toxicity: *а* — roots; *б* — shoots

Однією з причин підтримання водного балансу на рівні контролю рослинами, вирощеними в умовах алюмотоксичності, може бути адаптивний механізм зниження гідравлічної провідності коренів за дії цього стресора (Zhao et al., 1987). За нормальних умов вода надходить до судин ксилеми кореня апопластним шляхом – спрацьовують сили гідравлічної провідності коренів. Із зниженням інтенсивності транспірації вода починає транспортуватися симпластним шляхом, унаслідок чого зменшується гідравлічна провідність коренів. Симпластний рух дає змогу ефективніше регулювати надходження води до клітин, збільшуючи водопоглинальну здатність кореневої системи за несприятливих умов (Казнина и др., 2011). До контролювання цих процесів залучені комплексні регуляторні механізми передачі сигналу. Дж. Комсток (Comstock, 2002) вказує на синергічну дію двох типів сигналів, що регулюють ксилемний і транспіраційний потоки, рухи клітин-замикачів, випаровування води та газообмін, — гідравлічний (зміна гідравлічної провідності коренів, кавітаційні зміни у ксилемних елементах) і хімічний (активація синтезу та ксилемного транспорту абсцизової кислоти).

З-поміж великої кількості адаптивних реакцій рослин виняткове значення мають фізіологічні перебудови на функціональному рівні. Такі перебудови тісно пов'язані з анатомо-морфологічними модифікаціями, які відбуваються у відповідь на зміни в навколишньому середовищі. Однією з таких адаптаційних відповідей на фітотоксичність ґрунту є зміни в продиховому апараті листків рослин (Zhang et al., 2007). Тому, крім прямих вимірювань відносної тургоресцентності тканин досліджуваних рослин, проведено мікроскопічне дослідження продихів епідерми справжніх листків, що формувалися за дії алюмокислого стресу та в контролі.

Для адаксіального й абаксіального епідермісу характерним виявилося зниження кількості продихів на одиницю площі під впливом алюмінію (рис. 2). Ступінь же дії фітотоксиканта був різним: на адаксіальній поверхні кількість продихів на 1 мм^2 була меншою на 9 %, тоді як на абаксіальній поверхні — на 30 %.

Зміни у співвідношенні відкритих і закритих продихів також зафіксовані на адаксіальній поверхні справжніх листків необроблених рослин, де спостерігали 78 % відкритих продихів від їхньої загальної кількості на 1 мм^2. У рослин, вирощених на живильному середовищі з додаванням алюмінію,

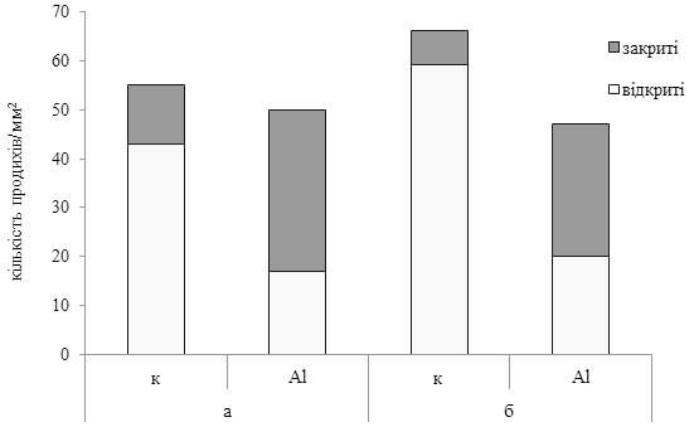

Рис. 2. Зміни у співвідношенні відкритих та закритих продихів на адаксіальному й абаксіальному епідермісі справжніх листків *Fagopyrum esculentum* за дії алюмінію: *а* — адаксіальний епідерміс; *б* — абаксіальний епідерміс; к — контроль; Al — 50 мкМ алюмінію

Fig. 2. Changes in ratio of open and closed stomata in adaxial and abaxial epidermis of *Fagopyrum esculentum* leaves under aluminium treatment: *a* — adaxial epidermis; *б* — abaxial epidermis; к — control; Al — 50 μM aluminium

цей показник сягав 34 % від загальної кількості продихів. Світлооптичне дослідження абаксіальної поверхні підтвердило тенденцію до закриття продихів за дії алюмінію: 86 % відкритих продихів на живильному середовищі Кнопа, 42 % — з додаванням алюмінію (рис. 2).

Такий ефект Al щодо формування продихового апарату рослин може спричинюватися впливом токсиканта на поділ протодермальних клітин-попередників, з яких утворюються клітини-замикачі майбутнього продиху (Bergmann, 2004). Схожі ефекти важких металів виявлені й на інших культурах (Zhu et al., 2005; Greger, Johansson, 2006).

Важливу роль у регуляції водного статусу рослини відіграє апертура продихів, яка регулюється тургор-індукованими змінами розмірів клітин-замикачів (Özyiğit, Akinci, 2009). Порівнюючи співвідношення закритих і відкритих продихів, можна зазначити, що в рослин, справжні листки яких формувалися за умов алюмокислого стресу, на нижньому і верхньому епідермісі спостерігалося повне або часткове закриття продихів (рис. 3).

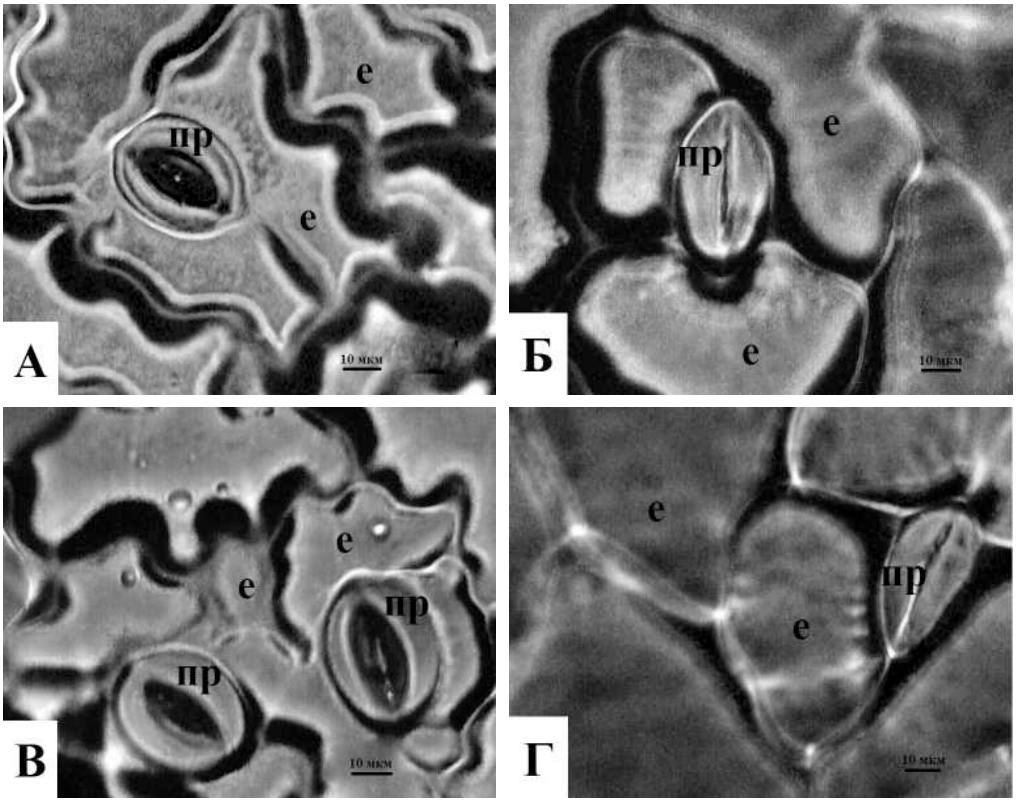

Рис. 3. Стан продихів епідермісу справжніх листків *Fagopyrum esculentum*. А — адаксіальна поверхня за контрольних умов; Б — адаксіальна поверхня за дії алюмінію; В — абаксіальна поверхня за контрольних умов; Г — абаксіальна поверхня під впливом алюмінію: пр — продих, е — епідермальна клітина

Fig. 3. Stomatal state in epidermis of *Fagopyrum esculentum* leaves: A — control, adaxial surface; Б — aluminium treatment, adaxial surface; B — control, abaxial surface; Г — aluminium treatment, abaxial surface: пр — stoma, е — epidermal cell

Таблиця 2. **Стоматографічні параметри епідерми справжніх листків *Fagopyrum esculentum* в умовах алюмокислого стресу (M±m), n=30**

Стоматографічні показники	Варіанти досліду			
	адаксіальна поверхня		абаксіальна поверхня	
	контроль	50 мкМ алюміній	контроль	50 мкМ алюміній
ДКЗ (мкм)	33,64±1,46	29,8 ±1,14*	30,28±1,68	40,57±2,76*
ШКЗ (мкм)	23,28±0,98	19,85±1,03*	23,57±0,34	22,85±0,48*
ПП (мкм^2)	614,76±11,42	465,2±11, 93*	560,25±5,78	727,71±13,43*
ШПА (мкм)	9,27±0,68	4,65±0,47*	9,81±0,63	5,23±0,53*

У ході досліджень зафіксовано, що ширина продихової апертури (ШПА) відкритих продихів у досліджуваних рослин зменшилася на 50 % і 47 %, відповідно на адаксіальній та абаксіальній поверхнях. Також виявлено, що додавання алюмінію до живильного середовища вплинуло на розмір клітин-замикачів та загальну площу продихів (ПП).

Зменшення загальної площі беспосередньо пов'язане з рівнем відкритості продихової щілини і шириною клітин-замикачів (ШКЗ), такий ефект спостерігався на адаксіальній поверхні — зменшення площі на 25 %. Протилежний ефект зафіксований на абаксіальній поверхні листків, де загальна площа продихового комплексу зросла на 28 % завдяки збільшенню довжини клітин-замикачів (ДКЗ) (табл. 2).

Існують різні дані про вплив екологічних чинників на продиховий апарат рослин в умовах водного дефіциту. Згідно із законом Заленського, водний дефіцит призводить до появи ознак ксероморфності — зменшення розмірів клітин та органів і збільшення кількості продихів. При цьому розміри продихів практично не змінюються, що, очевидно, засвідчує фенотипічну стійкість цієї ознаки (Гуменюк, Мусатенко, 2006). Однак існують суперечливі дані, які вказують на зміни розмірів клітин-замикачів, а саме — на зменшення їхньої довжини (Казнина и др., 2011). Б. Ломакс зазначає, що зміни концентрації CO_2, фотосинтетично активної радіації, вплив УФ-випромінювання та фітопатогенів сприяли збільшенню довжини клітин-замикачів у модельних дослідженнях на *Arabidopsis thaliana* (L) Heym. (Lomax et al., 2009). Подовження продихів також зафіксовано у *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, *Manihot esculenta* L. та *Dioscorea esculenta* L. в умовах затінення (Pompelli et al., 2010).

На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що структурно-морфометричні зміни в справжніх листках та їхніх продихах, які формувалися в умовах алюмокислого стресу, можуть вказувати на адаптивний тип морфогенезу гречки. За дії токсиканта відбуваються екологічно зумовлені перебудови анатомічних структур епідерми на обох поверхнях листків, що є проявом морфофізіологічної адаптації, яка підтримує сталий стан гідратури рослинних клітин кореня і пагона та є необхідною для забезпечення життєздатності в умовах алюмінієвої токсичності. Не виявлені нами достовірні зміни в накопиченні фітомаси надземною і підземною частинами рослин із зменшенням їхніх лінійних розмірів можуть свідчити про компенсацію на рівні водного статусу. Адаптивна реакція рослин може ґрунтуватися на швидких змінах гідравлічної провідності відповідно до транспіраційних потреб. Такий механізм може забезпечувати підтримання водонасиченості листків за дії токсиканта, що порушує баланс між поглинанням води та її втратами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Греков В.О., Панасенко В.М. Стан родючості ґрунтів України за даними VIII туру агрохімічної паспортизації земель сільськогосподарського призначення. — К. : Мінагрополітики, Центрдержродючість, 2009. — 48 с.

Гуменюк І.Д., Мусатенко Л.І. Анатомічні особливості вегетативних органів *Persicaria amfibia* (L.) Delarbre за умов помірного водного дефіциту // Укр. ботан. журн. — 2006. — **63**, № 5. — С. 699—712.

Жук О.І. Транспорт води в рослинах // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. біол. — 2010. — **11,** № 905. — С. 212—216.

Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. Здоровье среды: методы оценки. — М.: Центр экол. политики, 2000. — 68 с.

Злобін Ю.А., Скляр В.Г., Бондарєва Л.М., Кирильчук К.С. Концепція морфометрії у сучасній ботаніці // Чорномор. ботан. журн. — 2009. — **5**, № 1. — С. 5—22.

Казнина Н.М., Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние кадмия на водный обмен растений ячменя // Тр. Карельского научн. центра РАН. — 2011. — **3**, № 1. — С. 57—61.

Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. — М.: «Дрофа», 2010. — 610 с.

Паршикова Т.В. Фізіологія рослин. Практикум. — Луцьк: ВМА «Терен», 2010. — 416 с.

Bergmann D. C. Integrating signals in stomatal development // Current Opinion in Plant Biol. — 2004. — **7**(1). — P. 26—32.

Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant // Functional Plant Biol. — 2003. — **30**(3). — P. 239—264.

Comstock J.P. Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**(367). — P. 195—200.

Elagoz V., Han S.S., Manning W.J. Acquired changes in stomatal characteristics in response to ozone during plant growth and leaf development of bush beans *Phaseolus vulgaris* L. indicate phenotypic plasticity // Environ. Pollut. — 2006. — **140**(1). — P. 395—405.

Hede A.R., Skovmand B., Lopez-Cesati. Acid soils and aluminum toxicity. Application of physiology in wheat breeding. — Mexico, D.F.: CIMMYT, 2001. — P. 172—182.

Greger M., Johansson M. Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*) // Physiol. Plant. — 2006. — **86**(3). — P. 465—473.

Lomax B.H., Woodward F.I., Leitch I.J., Knight C.A., Lake J.A. Genome size as a predictor of guard cell length in *Arabidopsis thaliana* is independent of environmental conditions // New Phytol. — 2009. — **181**(2). — P. 311—314.

Marba N., Duarte C.M., Agusti S. Allometric scaling of plant life history // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2007. — **104**(40). — P. 15777—15780.

Orcen N., Nazarian Gh., Gharibkhani M. The responses of stomatal parameters and SPAD value in Asian tobacco exposed to chromium // Pol. J. Environ. Stud. — 2013. — **22**(5). — P. 1441—1447.

Özyiğit I.I., Akinci Ş. Effects of some stress factor (aluminium, cadmium and drought) on stomata of Roman nettle (*Urtica pilulifera* L.) // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cl. — 2009. — **37**(1). — P. 108—115.

Pompelli M.F., Martins S.C., Celin E.F., Ventrella M.C., DaMatta F.M. What is the influence of ordinary epidermal cells and stomata on the leaf plasticity of coffee plants grown under full-sun and shady conditions? // Braz. J. Biol. — 2010. — **70**(4). — P. 1083—1088.

Rout G.R., Samantaray S., Das P. Aluminium toxicity in plants: a review // Agronomie. — 2001. — **21**(1). — P. 3—21.

Shen R.F., Chen R.F., Ma J.F. Buckwheat accumulates aluminum in leaves but not in seeds // Plant and Soil. — 2006. — **284**(1-2). — P. 265—271.

Zhang X., Liu P., Yang Y.S., Xu G. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes // Bot. Stud. — 2007. — **48**(1). — P. 435—444.

Zhao X.J., Sucoff E., Stadelmann E.J. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells // Plant Physiol. — 1987. — **83**(1). — P. 159—162.

Zheng S.J., Ma J.F., Matsumoto H. High aluminium resistance in buckwheat. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips // Plant Physiol. — 1998. — **117**(3). — P. 745—751.

Zhu R., Macfie S.M., Ding Z. Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy // J. Exp. Bot. — 2005. — **56**(421). — P. 2831—2838.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 27.05.2014 р.

А.Е. Смирнов, А.М. Косян, О.И. Косык, Н.Ю. Таран
ОНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *FAGOPYRUM ESCULENTUM* В УСЛОВИЯХ АЛЮМОКИСЛОГО СТРЕССА

Изучено влияние ионов алюминия на морфометрические показатели и водный статус растений гречихи обыкновенной. Проведен стоматографический скрининг эпидермиса листьев, сформировавшихся в условиях алюмокислого стресса. Добавление алюминия в питательную среду приводит к уменьшению количества устьиц на обеих поверхностях листа, частичному или полному их закрытию. Выявлено, что водонасыщенность тканей у исследуемых растений остается на уровне контроля. При этом изменяются линейные размеры подземной и надземной частей растений и не снижается сырая фитомасса.

К л ю ч е в ы е с л о в а: Fagopyrum esculentum, *морфометрический анализ, водный статус, алюмокислый стресс, адаптация, алюморезистентность.*

O.E. Smirnov, A.M. Kosyan, O.I. Kosyk, N.Yu. Taran
Educational and Scientific Centre «Institute of Biology», Taras Shevchenko National University of Kyiv

MORPHOPHYSIOLOGICAL TRAITS OF *FAGOPYRUM ESCULENTUM* IN RESPONSE TO ALUMINIUM-ACID STRESS

We studied the effect of aluminium ions on morphometric traits and water status of common buckwheat. It was carried out a screening study of stomatal parameters at leaf epidermis generated under aluminium-acid stress. Addition of aluminium to the growth medium led to decrease in stomatal density on both leaf sides and partial or total stomatal closure. It was revealed that relative water content of plant tissues was similar to the control level. Though linear dimensions of underground and aerial parts were decreased, no significant changes of fresh phytomass were observed.

K e y w o r d s: Fagopyrum esculentum, *morphometric analysis, water status, aluminium-acid stress, adaptation, aluminium resistance.*