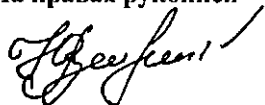


На правах рукописи



БЕНЖИК
Юлия Валерьевна

**АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
РАСТЕНИЙ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. С
ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬЮ**

03.00.05 – “Ботаника”

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2001

Диссертация выполнена в Петрозаводском государственном университете на кафедре ботаники и физиологии растений эколого-биологического факультета

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Марковская Е.Ф.

Научный консультант: кандидат биологических наук Николаевская Т.С.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук Жукова Г.Я.;
кандидат биологических наук Маслова Т.Г.

Ведущая организация: Институт леса Карельского научного центра
Российской Академии наук

Защита состоится "16" января 2002г. в 14 час.

на заседании диссертационного совета К 002.211.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ботанического института им. В.Л. Комарова.

Автореферат разослан "___" _____ 2001г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Юдина О.С.

БИБЛИОТЕКА
Карельского научного
центра РАН

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Современная проблема биоразнообразия живой природы тесно связана с резервами внутривидовой изменчивости видов, которые определяются генетическим фондом популяции (Тимофеев-Ресовский и др., 1973). Сравнительно недавно внимание ряда исследователей привлек феномен супрессированной хлорофиллдефектности (Инге-Вечтомов и др., 1994; Олимпиенко и др., 1999; 2001), выявляемой, как правило, в условиях лабораторного эксперимента. В частности, в лаборатории генетики Института биологии КарНЦ РАН на овсянице луговой (*Festuca pratensis* Huds., *Poaceae*) показано наличие широкого спектра хлорофильных мутаций ядерного типа, фенотипическое проявление которых подавлено (супрессировано) в естественных условиях (Олимпиенко и др., 1982; 2001; Олимпиенко, Лебедева, 1994 и др.). Хлорофиллдефектные фенотипы с различной степенью депигментации обнаруживались только при определенных температурных условиях (35-37° С). При возвращении оптимальной температуры (20-25° С) супрессия восстанавливалась, и хлорофиллдефектность проростков исчезала. Уникальность данного феномена связана с существованием в естественной популяции жизнеспособных растений широкого диапазона депигментации. Генетические и физиологические механизмы этого особого класса хлорофиллдефектности в настоящее время интенсивно изучаются (Олимпиенко и др., 1999; 2001 и др.). Работы по описанию ее фенотипического (анатомо-морфологического) проявления в литературе практически отсутствуют. В то же время хорошо известны и достаточно полно описаны фенотипическая и анатомо-морфологическая картины уже известного традиционного типа хлорофильных мутаций, индуцированных факторами разной природы, — физическими, химическими и т.д. (Калам, Орав, 1974; Насыров, 1975; Inada et al., 1993; Iba, Kusumi, 1998; Kubicka, Gabara, 1998 и др.). Все это дает основание предполагать, что исследуемый нами вид хлорофиллдефектности должен иметь специфическое проявление в анатомии и морфологии структуры листа и побега, позволяющее расширить существующие представления об анатомо-морфологическом разнообразии популяционной структуры злаков, в частности *F. pratensis*, а также механизмах адаптации растений.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования явилось изучение анатомо-морфологических особенностей хлорофил-

лдефектных растений овсяницы луговой (*Festuca pratensis*). В задачи исследования входило: 1) выявить особенности морфологии побега и листа взрослых зеленых растений овсяницы луговой по четырем основным фенотипическим группам (*норма* – зеленые, *виридис* – светло-зеленые, *ксанта* – желтые, *альбина* – белые); 2) изучить особенности мезо- и ультраструктуры листа отдельных фенотипов хлорофиллдефектных проростков овсяницы луговой и выращенных из них взрослых зеленых растений; 3) оценить жизнеспособность семенного потомства хлорофиллдефектных растений.

Научная новизна. Впервые дана анатомо-морфологическая характеристика побега и листа растений *F. pratensis* с температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектностью, описаны типы ультраструктуры хлоропластов у хлорофиллдефектных проростков и выращенных из них взрослых растений овсяницы луговой, оценена жизнеспособность семенного потомства хлорофиллдефектных растений.

Теоретическая и практическая ценность работы. Проведенное исследование является ботаническим фрагментом работы по изучению генетической структуры популяции *F. pratensis*. В основе работы использован широко применяемый в генетико-селекционных исследованиях и практически не включенный в ботанические исследования лабораторный подход (выращивание растений с температурозависимой хлорофиллдефектностью при высокой температуре), позволяющий дифференцировать растения и на этой основе проводить количественную оценку биоразнообразия популяции. Выявленное в работе разнообразие морфологических характеристик листа и побега, типов ультраструктуры хлоропластов у каждой фенотипической линии позволило составить картину об анатомо-морфологическом составе растений в панмиктической популяции. Изученные экспериментальные линии предлагаются для использования в селекционных целях и, в частности, при отборе растений с повышенным репродуктивным потенциалом.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на научных конференциях студентов и аспирантов Петрозаводского государственного университета (Петрозаводск, 1999; 2000; 2001), Международных конференциях: “Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Финляндии” (Петрозаводск, 1999), “Биоразнообразие Европейского Севера: теоретические основы изучения, социально-правовые ас-

пекты использования и охраны” (Петрозаводск, 2001) и “Биологические ресурсы и устойчивое развитие” (Пушино, 2001), семинарах Карельского (Петрозаводск, 2001) и Санкт-Петербургского (Санкт-Петербург, 2001) Всероссийского ботанического общества.

Публикации результатов исследования. Автором опубликовано 17 работ, из них 12 по теме диссертации (в том числе 1 в печати).

Организация, объем исследований и личный вклад автора. Работа выполнялась на кафедре ботаники и физиологии растений Петрозаводского государственного университета, в лаборатории генетики Института биологии КарНЦ РАН и в лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН в 1998-2001 гг. при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Интеграция” (проект № 1.5-14). Исследование проводилось в соответствии с планом научно-исследовательской темы Института биологии КарНЦ РАН “Стратегия и механизмы выживаемости панмиктических популяций”. Экспериментальные материалы (90%) диссертационной работы получены лично соискателем.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 164 страницах текста, представлен в 29 таблицах и 20 рисунках. Список литературы включает в себя 285 источников, из них 117 – иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую сердечную благодарность научному руководителю Е.Ф. Марковской и научному консультанту Т.С. Николаевской за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации. Автор от всей души благодарен сотрудникам лаборатории генетики Института биологии КарНЦ РАН и ее руководителю – д.б.н. Г.С. Олимпиаенко за бесценную помощь и предоставленную возможность совместной работы над уникальным объектом. Я также искренне признателен всем сотрудникам лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН и лично Е.А. Мирославу и Н.К. Котеевой за методическую помощь и рекомендации при обсуждении материалов. Большую благодарность автор выражает всем сотрудникам кафедры ботаники и физиологии растений ПетрГУ. Самые теплые слова благодарности автор приносит своему мужу, родителям, а также родным и близким за понимание, терпение и всестороннюю помощь на всех этапах работы над диссертацией.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В главе приводится анализ литературных источников, посвященных общим закономерностям формирования анатомической и морфологической структуры нормальных хлоропластов высших растений, изменениям их в онтогенезе и под влиянием различных факторов. Это позволило рассмотреть широкий диапазон различных ультраструктурных трансформаций, происходящих в хлоропластах как в результате внутренних перестроек, так и при действии факторов внешней среды. Рассматривается эффект хлорофиллдефектности на уровне мезо- и ультраструктуры мезофилла различных растений. Отдельный раздел посвящен анализу морфологии и анатомии листа объекта исследования – фестукоидных злаков.

Проведенный анализ показал, что наряду с достаточно хорошей изученностью морфолого-анатомических признаков у хлорофиллдефектных растений в их традиционном понимании, в литературе отсутствуют аналогичные данные для растений со скрытой хлорофиллдефектностью, в том числе и по анатомо-морфологическим особенностям, что свидетельствует об актуальности данного исследования.

ГЛАВА 2. Объект и методики исследования.

2.1 Объект исследования. Объектом исследования явились растения овсяницы луговой (*Festuca pratensis*) с температурозависимыми хлорофильными мутациями ядерного типа (Олимпненко и др., 1999, 2001 и др.).

2.3. Методики исследования. В работе использованы стандартные методы морфологической полевой оценки растений, анатомические методы оценки структуры мезофилла при использовании световой и электронной микроскопии (Аксенов, 1967; Паушева, 1974; Мокроносов, Борзенкова, 1978; Силаева, Силаев, 1979; Фурст, 1979; Кахнович, 1980), методы оценки всхожести и энергии прорастания семян (Практикум по селекции..., 1968; Гуляев, Мальченко, 1975) и стандартная статистическая обработка результатов с использованием дисперсионного и корреляционного анализов (Зайцев, 1973; 1990).

Полевые исследования по морфологической оценке растений выполнялась на Агроботанической станции Института биологии КарНЦ РАН в течение трех вегетационных сезонов (1998-2000 годов) на растениях овсяницы луговой в момент их цветения. Исследованы морфологические особенности 44 фенотипов, 880 растений из трех экспе-

риментальных клоновых питомников. Анатомические исследования выполнены на растениях 4 основных фенотипов (зеленый – *norma*, светло-зеленый – *viridis*, желтый – *xantha* и белый – *albina*) в лаборатории генетики Института биологии КарНЦ РАН и в лаборатории анатомии и морфологии БИН РАН. Посевные качества семян оценивались на 13 основных фенотипах родительских растений.

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение.

3.1. Морфологическая характеристика побега и листа растений *Festuca pratensis*. Взрослые зеленые растения овсяницы луговой с температурозависимой супрессированной (подавленной) хлорофиллдефектностью были выращены из хлорофиллдефектных проростков разных фенотипов: исходно зеленые растения (из зеленых проростков), *vir*-ревертаны (из светло-зеленых проростков), *xa*-ревертаны (из желтых проростков) и *alb*-ревертаны (из бесцветных проростков). Растения различных фенотипических групп существенно различаются между собой по морфологии листа и побега. Так, например, по мере усиления степени дефекта в ряду фенотипов от исходно зеленых растений к *alb*-ревертантам наблюдается уменьшение мощности кустов, снижение числа генеративных побегов, уменьшение частоты растений с листьями направленными строго вверх, снижение интенсивности окраски листьев, уменьшение веса семян на одно соцветие. На основе полученных данных составлены морфологические характеристики листа и побега для каждой из фенотипических групп (табл. 1).

Подобные характеристики составлены и для остальных двух лет наблюдений. Отмечено, что морфологический статус растений с супрессированной хлорофиллдефектностью за три года вегетации существенно изменился: чаще стали встречаться слабые невысокие растения, снизились линейные размеры и площадь листьев, вес семян на одно соцветие, в 2-3 раза уменьшилось число генеративных побегов, усилилась антоциановая окраска узлов побега и снизилась интенсивность окраски листьев. Кроме того, на третий год наблюдения отмечается выравнивание фенотипических групп по частотам встречаемости растений с разными морфологическими характеристиками. Это может свидетельствовать о появлении признаков старения растений (Гупало, 1969; Берг, 1975).

Таблица 1

Морфологические характеристики побега и листа взрослых растений овсяницы луговой с температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектностью (второй год наблюдений – 1999)

Фенотип	Морфологические характеристики
Исходно зеленые растения	Кусты мощные, полураскидистые. Листья направлены вверх, темно-зеленые или зеленые. Узлы генеративных побегов слабоокрашенные. Растения самые невысокие в имеющемся спектре – 104.89 см, соцветия самые короткие – 19.05 см, число генеративных побегов наибольшее – 115. Лист генеративного побега самый короткий и самый узкий, вегетативного – самый длинный и узкий. По площади генеративный лист наименьший – 9.48; вегетативный лист большой площади – 13.24 см ² . Вес семян – 0.75 г.
Vir-ревертанты	Кусты средней мощности, полураскидистые. Листья направлены строго вверх или повислые, зеленые и темно-зеленые. Узлы генеративных побегов слабоокрашенные. Растения самые высокие – 110.2 см, соцветия самые длинные – 22.5 см, число побегов среднее – 65. Площадь генеративного листа значительно больше, чем у нормы – 11.45, вегетативного – меньше – 11.92 см ² . Вес семян наибольший – 1.02 г.
Ха-ревертанты	Кусты средней мощности, полураскидистые. Листья повислые, зеленые и темно-зеленые. Узлы генеративных побегов слабоокрашены. Растения средней высоты – 106.45 см, соцветия крупные – 22.1 см, число побегов – 58. Листья самой большой площади генеративный – 11.98, вегетативный – 13.41 см ² . Вес семян – 0.69 г.
Alb-ревертанты	Кусты средней мощности, полураскидистые. Листья повислые, зеленые. Узлы интенсивно окрашены. Высота растений 106.7 см, соцветия средней длины – 21.35 см, число побегов минимально – 51. Генеративные листья длинные, вегетативные – короткие и узкие. Генеративный лист средней площади – 10.79, вегетативный – минимальной – 11.22 см ² . Вес семян – наименьший – 0.56 г.

3.2 Анатомическая характеристика мезофилла листа растений *Festuca pratensis*. 3.2.1 Особенности структуры клеток мезофилла у растений *Festuca pratensis*. Хлоренхима листа фестукоидного типа считается по литературным данным гомогенной, состоящей из клеток приблизительно одинаковой формы и размеров (Brown, 1958; Metcalfe, 1960; Николаевский, 1970, 1972; Carolyn et al., 1973; Цвелев, 1976; Поздеев, 1999 и др.). Тем не менее, у растений *Festuca pratensis* дикого типа под абаксиальной эпидермой обнаружен довольно плотный слой палисадных клеток, длина которых более, чем в 2 раза превышает ширину. Они отличаются от клеток центральной части мезофилла листа по форме, размерам и количеству хлоропластов (табл. 2).

Таблица 2

Количественные характеристики клеток мезофилла листа овсяницы луговой

Параметры клеток мезофилла	Взрослые растения		Проростки	
	Удлиненные клетки	Округлые клетки	Удлиненные клетки	Округлые клетки
Длина (мкм)	34.2±0.5	25.1±0.3***	31.4±0.7	20.8±0.5***
Ширина (мкм)	17.3±0.3	18.7±0.3***	14.2±0.3	14.5±1.5
Длина/ширина (мкм)	2.1±0.04	1.4±0.02***	2.2±0.06	1.5±0.03***
Площадь(мкм ²)	595±14.2	480±12.7***	448±15.2	304±11***
Объем (тыс. мкм ³)	4.95±0.2	5.7±0.2*	3.9±0.3	2.4±0.2***
Количество хлоропластов в клетке (шт.)	19±0.4	13±0.3***	16±0.3	11±0.3***
Число хлоропластов на 10 ⁴ мкм ²	336±16	297±12*	354±16	316±11

Примечание: различия между удлиненными и округлыми клетками достоверны при * - p>0.5; ** - p>0.1; *** - p>0.01.

Анализ структуры мезофилла овсяницы луговой показал, что лист этого злака можно отнести к переходному типу между листом с дифференцированной и недифференцированной хлоренхимой.

3.2.2 Особенности структуры клеток мезофилла у растений *Festuca pratensis* с температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектностью. Общая структура клеток мезофилла у растений с температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектностью сходна с диким типом, но выявлены характерные особенности. Так, у наиболее нарушенных хлорофиллдефектных вариантов (фенотипы *ксанта* и *альбина*) наблюдается более четко выраженный, чем у других, слой палисадных клеток как под адаксальной, так и под абаксальной эпидермой.

Дисперсионный двухфакторный анализ показал, что структурно-функциональные особенности хлоренхимы листа овсяницы луговой (форма клеток и их локализация) являются существенным фактором (77%), определяющим варьирование количества хлоропластов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние фенотипа растений овсяницы луговой с различными хлорофильными дефектами (фактор 1) и структурно-функциональных особенностей клеток мезофилла листа (фактор 2) на количество

в них хлоропластов.

Варьирование данных	Сумма квадратов отклонений	Степень свободы	Дисперсия	Критерий Фишера		Доля (%) влияния фактора
				F	F(крит.)	
По градациям 1 фактора	70.98	15.00	4.73	6.42	2.40	22.69
По градациям 2 фактора	230.73	1.00	230.73	313.0	4.54	73.77
Остаточное	11.06	15.00	0.74			3.54
Общее	312.76	31.00				

3.3 Ультраструктура клеток мезофилла растений *Festuca pratensis*. 3.3.1 Ультраструктура клеток мезофилла у хлорофиллдефектных проростков. Исследование особенностей мезо- и ультраструктуры листа четырех основных фенотипов хлорофил-

лдефектных проростков: зеленый (*norma*), светло-зеленый (*viridis*), желтый (*xantha*) и белый (*albina*) показало, что они специфически отличаются по форме и степени развития структурных компонентов органелл (хлоропластов и митохондрий). Хлоропласты зеленых проростков имеют правильную линзовидную форму, четко структурированы. Хлоропласты светло-зеленого фенотипа также хорошо развиты, однако отличаются большей степенью развития системы межгранальных тилакоидов и более крупными крахмальными зернами (визуально), а также небольшой дезорганизацией гран. Митохондрии в обоих случаях имеют одинаково развитую систему крист. У желтых проростков обнаруживаются пластиды двух типов. Первый – это мелкие, округлые, недифференцированные пластиды, в стромах которых отмечаются единичные тилакоиды и значительные скопления пластоглобул различных размеров. Второй – хлоропласты, тилакоидная система которых представлена мелкими (2-5 тилакоидов) гранами и многочисленными тилакоидами строма. Митохондрии хорошо развиты. У белых проростков обнаруживаются только недифференцированные пластиды, бесформенные, с множеством выростов и инвагинаций. Система крист митохондрий у этого фенотипа развита слабо. Различия между фенотипами касаются и биометрических характеристик: размеров клеток, числа и размеров хлоропластов и митохондрий (табл. 4, 5). Наибольшими значениями биометрических показателей характеризуется светло-зеленый фенотип.

3.3.2 Ультраструктура клеток мезофилла у растений *Festuca pratensis* с температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектностью. Взрослые зеленые растения овсяницы разных фенотипических групп (исходно зеленые, *vir*-ревертаны, *ха*-ревертаны и *alb*-ревертаны) существенно различались по размерам клеток, числу, размерам и форме органелл (табл. 4, 5). Визуально взрослые растения всех фенотипических групп не имели выраженных отличий по окраске листьев. Однако ультраструктурная организация хлоропластов существенно различалась, и каждый из ревертантов имел свой специфический характер изменений (табл. 6). На основании выше изложенного описаны типы ультраструктуры хлоропластов для каждой из фенотипических групп (табл. 7).

Таблица 4

Размеры клеток мезофилла и органелл хлорофиллдефектных растений *Festuca pratensis*

Размеры клеток и органелл	Хлорофиллдефектные проростки				Взрослые растения			
					Исходно зеленые	Ревертанты		
	<i>Norma</i>	<i>Viridis</i>	<i>Xantha</i>	<i>Albina</i>		<i>Vir-</i>	<i>Ха-</i>	<i>Alb-</i>
	<i>Клетки</i>							
Длина, мкм	13.8±0.2	13.5±0.3	14.2±0.3	14.6±0.8	27.7±0.7	29.5±1.0	32.5±1.1 ***	41.1±0.9 ***
Ширина, мкм	9.2±0.4	8.8±0.6	10.0±1.5	10.3±0.6	15.8±0.4	19.2±0.5 ***	17.1±0.6	20.0±0.6 ***
Площадь среза, мкм ²	127±17	120±10	142±14	151±13	437±16	566±25 ***	556±30 ***	822±32 ***
Объем, тыс. мкм ³	1.3±0.1	1.1±0.2	1.6±0.3	1.7±0.2	3.7±0.2	5.3±0.3 ***	5.2±0.5 ***	8.8±0.6 ***
	<i>Пластиды</i>							
Длина, мкм	4.0±0.5	4.6±0.3	4.0±0.2	Не изме- рялись	5.5±0.3	5.7±0.2	5.5±0.2	6.7±0.3 **
Ширина, мкм	1.6±0.1	2.3±0.1 **	1.9±0.1	—	2.4±0.1	2.9±0.1 **	3.2±0.1 ***	3.6±0.3 ***
Площадь среза, мкм ²	6.4±0.9	10.6±0.8- ***	7.5±0.6	—	13.2±0.7	16.5±0.9 *	17.7±0.8 ***	24.1±2.1 ***
Объем 1 пластиды, мкм ³	11.8±2.0	28.1±2.9- ***	15.4±2.0	—	16.3±2.0	26.4±2.8 *	29.8±1.9 **	45.5±6.7 ***
	<i>Митохондрии</i>							
Площадь среза, мкм ²	0.2±0.02	0.3±0.02	0.2±0.02	0.3±0.04	0.3±0.03	0.9±0.09 ***	0.8±0.07 ***	0.7±0.06 ***
Объем 1 митохонд- рии, мкм ³	0.1±0.02	0.2±0.01	0.1±0.02	0.2±0.03	0.1±0.01	0.4±0.06 ***	0.3±0.04 ***	0.3±0.03 ***

Таблица 5

Число пластид и митохондрий в клетках мезофилла листа хлорофиллдефектных растений *Festuca pratensis*

Количество органелл	Хлорофиллдефектные проростки				Взрослые растения			
					Исходно зеленые	Ревертанты		
	<i>Norma</i>	<i>Viridis</i>	<i>Xantha</i>	<i>Albina</i>		<i>Vir-</i>	<i>Ха-</i>	<i>Alb-</i>
	<i>Пластиды</i>							
На срез клетки, шт	7±0.4	8±1.0	4±0.5 **	Не подсчи- тывалось	8±0.2	9±0.3 ***	8±0.3	10±0.2 ***
На 100 мкм ² , шт	55.5±3.5	66.1±3.6 **	28.2±5.5 **	—	18.3±0.7	15.9±1.5	14.4±0.9 **	12.2±0.4 **
	<i>Митохондрии</i>							
На срез, шт	5±0.3	9±1.0 ***	8±1.0 ***	7±1.0	10±0.7	10±0.7	7±0.4 ***	6±0.3 ***
На 100 мкм ² , шт	39.4±2.9	74.9±2.9 ***	56.3±6.2**	46.4±5.0	22.9±1.6	17.7±1.4 **	12.6±1.1 ***	7.3±0.6 ***
На 1 хлоро- пласт, шт	0.7±0.04	1±0.07 ***	2±0.04 ***	Не подсчи- тывалось	1.6±0.1	1.1±0.1 ***	0.9±0.06 ***	0.6±0.04 ***

Примечание. Проростки: *norma* – зеленые, *viridis* – светло-зеленые, *xantha* – желтые, *albina* – белые. Взрослые растения: *vir-* ревертанты от проростков *viridis*, *ха-* ревертанты от проростков *xantha*, *alb-* ревертанты от проростков *albina*. Различия между вариантами достоверны при * - $p>0.5$; ** - $p>0.1$; *** - $p>0.01$.

Таблица 6

Параметры структурных компонентов хлоропластов клеток мезофилла листа хлорофиллдефектных растений *Festuca pratensis*

Параметры структурных элементов	Исходно зеленые растения	Растения-ревертанты		
		<i>Vir-</i>	<i>Ха-</i>	<i>Alb-</i>
Диаметр гран, мкм	0.3±0.01	0.4±0.01 ***	0.4±0.01 ***	0.3±0.01
Число тилакоидов в грани, шт	6±0.6	8±0.2	8±0.3	9±0.6
Число элементов на 10 мкм² среза				
Гран	27±3	23±2	17±2***	12±1***
Пластоглобул	20±2	24±2	27±3	15±2*
Парциальный объем, %				
Гран	26.9±1.7	29.3±1.1	25.8±1.5	18.0±0.9*
Тилакоидов стромы	5.8±0.9	21.9±1.3 ***	14.2±1.1 ***	12.7±1.0 ***
Стромы	51.7±1.6	40.7±1.4 ***	55.7±1.5	57.5±1.2**
Пластоглобул	2.1±0.4	2.9±0.3	3.1±0.4	3.1±0.4
Крахмала	13.6±1.6	5.2±0.7***	1.2±0.3***	8.7±1.0**
Протяженность мембран тилакоидов, мкм				
Гранальных	90.7±8.2	122.8±4.1 ***	118.7±7.9 ***	90.1±5.6
Агранальных	38.7±2.3	63.5±2.6 ***	57.7±3.9 ***	56.2±2.3 ***
Коэффициент гранальности	2.4±0.2	1.9±0.1	2.0±0.2	1.6±0.1

Примечание. Условные обозначения в таблице 5.

Таблица 7

Типы ультраструктуры хлоропластов у растений *Festuca pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью

Фенотип	Типы ультраструктуры хлоропластов
Исходно зеленые	Хлоропласты правильной линзовидной формы, с большим количеством (27 на 10 мкм ² среза) малотилакоидных гран. Протяженность гранальных мембран – 91 мкм, агранальных – 39 мкм. Коэффициент гранальности 2.4, что свидетельствует о превалировании фотосистемы II у данного варианта. Парциальный объем пластоглобул – 2.1 %, крахмала – 13.6 %.
<i>Vir</i> -ревертанты	Хлоропласты линзовидной формы, число гран чуть меньше, чем у исходно зеленых (23), но они большего диаметра. Протяженность гранальных мембран – 122.8; агранальных – 63.5 мкм. Коэффициент гранальности 1.9. Встречаются деструктивные изменения гран: раздутые тилакоиды, гофрированные грани. Парциальный объем пластоглобул – 2.9%, число на 10 мкм ² среза – 24, объем крахмала – 5.2%.
<i>Ха</i> -ревертанты	Форма хлоропластов изменяется за счет роста короткой оси – хлоропласты округляются, раздуваются. Протяженность гранальных мембран – 118.7 мкм, агранальных – 57.7 мкм. Грани дезориентированы (нарушена ориентация вдоль длинной оси, не просматриваются тилакоиды на срезе грани). Парциальный объем пластоглобул – 3.1%, число – 27. Крахмала практически нет (1%).
<i>Alb</i> -ревертанты	Хлоропласты округлые, раздутые, гран мало (12), но число тилакоидов в грани возрастает (более теневой тип). Протяженность гранальных мембран – 90.1 мкм, агранальных – 56.2 мкм. Коэффициент гранальности – 1.6 (превалирует фотосистема I). Большинство гран дезориентировано. Объем стромы максимален. Число пластоглобул – 15, но они очень крупные (парциальный объем 3.1%). Крахмала – 8.7 %.

Успешность прохождения жизненного цикла каждым из изученных типов ревертантов дает основание рассматривать их особенно в качестве различных адаптационных и/или компенсаторных трансформаций, которые позволяют преодолеть негативные последствия су-

существующего генетического груза и возможного функционального дефицита. Так, у исходно зеленых растений количество гран максимально, но сами грани мелкие, малотилакоидные, что соответствует так называемому "световому" типу хлоропласта (Goodchild, 1972; Мирославов, 1999; и др.). У *alb*-ревертантов наоборот – возрастает среднее число тилакоидов в грани, но количество самих гран незначительно. Это характерно хлоропластам более "теневого" типа (Гамалей, Куликов, 1978; Anderson, 1999 и др.). Иной характер трансформации у *vir*- и *ха*-ревертантов – парциальный объем гран у них очень высокий, а также увеличена протяженность гранальных мембран за счет возрастания диаметра гран. У *vir*-ревертантов, кроме того, очень высоких значений достигает развитие системы межгранных тилакоидов.

Еще одной структурной особенностью хлоропластов у ревертантов является значительное варьирование парциальных объемов плстоглобул и крахмальных включений. Некоторые из изменений ультраструктуры хлоропластов, наблюдаемых у изученных растений, уже описаны для мутантов других типов (Калам, Орав, 1974; Насыров, 1975; Гуляева и др, 1980; Thomas, 1992 и др.). Однако ряд особенностей ультраструктуры не упомянут в известных литературных источниках, и, на наш взгляд, их можно считать специфически связанными с супрессированной хлорофиллдефектностью. К ним относятся – формирование палисадного мезофилла, появление хлоропластов более теневого типа, мощное развитие системы межгранных тилакоидов, почти полное отсутствие крахмальных включений, увеличение объемов пластоглобул от исходно зеленых к *alb*-ревертантам (по мере роста генетического груза), появление гофрированных гран.

3.4 Жизнеспособность потомства хлорофиллдефектных линий. Показатель всхожести семян проанализированных хлорофиллдефектных фенотипов оказался очень высок и колебался от 81% до 99% в продолжении третьего-пятого года жизни. По мере наблюдения в течение трех лет обнаруживается увеличение и всхожести, и энергии прорастания семян у растений фенотипов *ксанта* и *виридис*. Эта особенность данных фенотипов заслуживает внимания, так как может иметь практическую значимость. Следует отметить, что растения фенотипа *альбина* обладают почти самой наименьшей среди фенотипов энергией прорастания (53-82%) при довольно высокой всхожести семян (90-94%). Возможно, более глубокая степень генетического хлорофильного де-

фекта специфически сказывается на скорости ростовых процессов в зародышевой меристеме семян этих растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в составе естественной популяции овсяницы луговой присутствуют растения с температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектностью, которая экспериментально выявляется в виде фенотипов различной степени депигментации (Олимпиаенко и др., 1999; 2001). Анализ этих фенотипов в фазе проростков, выращенных в условиях высокой температуры, когда действие гена-супрессора ингибировано, показал, что они очень сильно различаются на уровне мезо- и ультраструктуры листа. Диапазон выявленных различий включает варьирование структуры хлоропластов от почти нормальных до состояния недифференцированных структур. Работа, выполненная на взрослых зеленых растениях-ревертантах, показала, что в каждой фенотипической группе присутствуют какие-либо структурные аномалии хлоропластов. Эти изменения можно интерпретировать как адаптационные трансформации, позволяющие, видимо, существовать особям данного типа, несмотря на давление естественного отбора (Олимпиаенко и др., 2001). Именно поэтому каждый фенотип оказался жизнеспособен и при возвращении в условия оптимальной температуры способен нормально вегетировать и давать достаточно полноценное потомство. Сравнительный анализ ряда морфологических показателей побега и листа разных фенотипов выявил изменения, свидетельствующие о тенденции ухудшения состояния растений от фенотипа *норма* до *альбина* (по мере роста уровня генетического груза). Поскольку в естественной популяции частоты растений фенотипов *ксанта* и *альбина* очень редки, то только используемый в работе методический подход, сочетающий генетический и анатомо-морфологический приемы, позволил рассмотреть весь фенотипический спектр популяции по признаку хлорофиллдефектности.

Заслуживает внимания отмеченный в работе факт появления признаков раннего старения растений, выращенных из хлорофиллдефектных проростков. Продолжительность жизни растений овсяницы луговой составляет 7-8, а при хорошем уходе 10-15 лет (Серебрякова, 1971). Полученные нами данные позволяют прогнозировать ускорение жизненного цикла изученных особей популяции. Эта гипотеза нуждается в экспериментальной проверке, но имеющиеся в литературе результа-

ты по продолжительности жизни мутантов свидетельствуют о правомочности нашего предположения (Thomas, 1983; 1992). Этот феномен сопровождается высоким уровнем всхожести семенного потомства дефектных растений, что так же может быть связано с укорочением общего жизненного цикла.

Сопоставление различных фенотипов по комплексу изученных морфолого-анатомических характеристик мезо- и ультраструктуры хлоропластов показало, что особое место среди изученных мутантов занимает светло-зеленый фенотип. По ряду параметров (высокое число хлоропластов и митохондрий, их крупные размеры, степень структурной сформированности органелл) он превосходит остальные фенотипы. Вероятно, именно данному типу мутации присущи наибольшие адаптивные возможности по сравнению с другими. Изучение этого фенотипа представляет интерес для последующего использования в селекции.

Анатомо-морфологическое исследование показало уровень структурного (в пределах анатомии листа и морфологии побега) проявления супрессированной хлорофиллдефектности. Выявленные особенности в организации хлоропластов свидетельствуют о нарушениях в структуре фотосинтетического аппарата.

Существование в популяциях растений с супрессированной хлорофиллдефектностью, по-видимому, повышает потенциальную адаптивность вида, его адекватность окружающей среде и может рассматриваться как один из генетических механизмов выживания растений, эволюционная значимость которого состоит в поддержании генетического разнообразия.

По результатам работы исследованные хлорофиллдефектные фенотипы *F. pratensis* могут быть рекомендованы для дальнейшего научного изучения и практического использования.

ВЫВОДЫ

1. Взрослые зеленые растения *Festuca pratensis* разных фенотипов с температурозависимой супрессированной (подавленной) хлорофиллдефектностью (исходно зеленые растения, выращенные из зеленых проростков; *vir*-, *ха*- и *alb*-ревертанты, выращенные, соответственно, из светло-зеленых, желтых и белых проростков) отличаются по следующим показателям: мощность и форма куста, число генера-

тивных побегов, ориентация листьев, окраска листьев и узлов, линейные размеры листьев и соцветий, вес семян. В ряду фенотипов от исходно зеленых растений к *alb*-ревертантам морфологический статус растений заметно ухудшается.

2. У взрослых растений *F. pratensis* с температурозависимой подавленной хлорофиллдефектностью на пятый год жизни отмечается снижение линейных размеров и площади листьев, веса семян на одно соцветие, числа генеративных побегов, усиление антоциановой окраски узлов побегов и снижение интенсивности окраски листьев, чаще встречаются слабомощные растения. Все эти признаки могут свидетельствовать о старении растений.
3. Хлорофиллдефектные проростки *F. pratensis* разных фенотипов (*норма* – зеленые, *виридис* – светло-зеленые, *ксанта* – желтые и *альбина* – белые) различаются по ультраструктуре хлоропластов и митохондрий. Показано, что в ряду от зеленых проростков к белым отмечается снижение степени сформированности этих органелл.
4. Взрослые зеленые растения-ревертанты *F. pratensis* разных фенотипов различаются по размерам, числу, форме хлоропластов и митохондрий. Показано, что в ряду от исходно зеленых растений к *alb*-ревертантам отмечается уменьшение числа органелл и увеличение размеров хлоропластов. Все типы ревертантов характеризуются митохондриями больших размеров, чем у исходно зеленых растений.
5. Взрослые зеленые растения *F. pratensis* разных фенотипов характеризуются специфическими изменениями в ультраструктуре хлоропластов. В ряду фенотипов от исходно зеленых растений к *alb*-ревертантам уменьшается число гран на единицу площади среза, растет парциальный объем пластоглобул. *Vir*- и *ха*-ревертанты отличаются наибольшей протяженностью мембран тилакоидов, для фенотипа *ксанта* характерен наименьший парциальный объем крахмальных включений.
6. Проростки и взрослые растения *F. pratensis* фенотипа *виридис* (светло-зеленый) характеризуются наибольшими (или одними из самых больших) среди изученных фенотипов числом и размерами органелл и максимальным развитием системы межгранных тилакоидов.

7. Выявлены специфические изменения в ультраструктуре хлоропластов взрослых зеленых растений-ревертантов *F. pratensis*, которые можно считать признаками супрессированной хлорофиллдефектности. К ним относятся: формирование палисадного мезофилла, формирование у разных фенотипов хлоропластов двух типов – светового и теневого, мощное развитие системы межгранных тилакоидов, полное отсутствие крахмальных включений у одного из ревертантов, увеличение объемов пластоглобул в ряду фенотипов по мере роста генетической нагрузки, появление гофрированных гран.
 8. Всхожесть семян исследуемых фенотипов *F. pratensis* очень высока, что рассматривается как специфическая особенность растений со скрытой хлорофиллдефектностью. Потомство растений фенотипа *виридис* характеризуется более высокой жизнеспособностью.
- Список работ, опубликованных по теме диссертации
1. Олимпниченко Г.С., Николаевская Т.С., Венжик Ю.В. Морфологическое разнообразие островных популяций злаков. Тезисы докладов VI молодежной научной конференции “Актуальные проблемы биологии и экологии”. Сыктывкар, 1999. С. 159.
 2. Олимпниченко Г.С., Венжик Ю.В., Николаевская Т.С. Морфогенетическое разнообразие островных популяций злаков. Тезисы IX Международного симпозиума по новым кормовым растениям “Эколого-популяционный анализ кормовых растений естественной флоры, интродукция и использование”. Сыктывкар, 1999. С. 136.
 3. Олимпниченко Г.С., Николаевская Т.С., Венжик Ю.В. Морфогенетическое разнообразие островных популяций злаков. Тезисы докладов Международной конференции и выездной сессии отделения Общей биологии РАН “Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Финноскандии”. Петрозаводск, 1999. С. 43.
 4. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С. Количество хлоропластов у хлорофильных мутантов овсяницы луговой как критерий компенсаторного состояния. Тезисы докладов VII молодежной научной конференции “Актуальные проблемы биологии и экологии”. Сыктывкар, 2000. С. 35-36.
 5. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С. Морфоанатомическая характеристика хлоропластов у хлорофиллдефектных растений *Festuca prat-*

- ensis* Huds. (Poaceae). Тезисы докладов 5-ой Молодежной конференции. Пушкино, 2001. С. 115.
6. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С. Морфологическое и ультраструктурное разнообразие хлорофиллдефектных растений *Festuca pratensis* Huds. (Poaceae). Тезисы докладов Международной конференции “Биоразнообразие Европейского Севера: теоретические основы изучения, социально-правовые аспекты использования и охраны”. Петрозаводск, 2001. С. 35-37.
7. Венжик Ю. В. Ультраструктурные фенотипы температурозависимой хлорофиллдефектности. Тезисы докладов Международной конференции “Актуальные вопросы экологической физиологии растений”. Сыктывкар, 2001. С. С. 183.
8. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С. Количество хлоропластов как индикатор степени хлорофильного дефекта. Тезисы докладов Международной конференции “Актуальные вопросы экологической физиологии растений”. Сыктывкар, 2001. С. 185.
9. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С., Олимпниченко Г.С., Марковская Е.Ф. Ультраструктура пластидного аппарата и адаптационные возможности супрессированной температурозависимой хлорофиллдефектности. Тезисы докладов Международной конференции “Биологические ресурсы и устойчивое развитие”. Пушкино, 2001. С. 36.
10. Олимпниченко Г.С., Лебедева О.Н., Тихов П.В., Стафеева Е.Б., Венжик Ю.В., Федоренко О.М., Савушкин А.И., Николаевская Т.С., Марковская Е.Ф. Генетический контроль механизмов супрессии у ревертантов по хлорофиллдефектности. Тезисы докладов Международной конференции “Биологические ресурсы и устойчивое развитие”. Пушкино, 2001. С. 171.
11. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С. Структурные особенности мезофилла листа овсяницы луговой. Бот. журн. 2001. Т. 86. № 10. С. 55-57.
12. Венжик Ю.В., Николаевская Т.С., Олимпниченко Г.С., Марковская Е.Ф., Мирославов Е.А., Котеева Н.К. Особенности ультраструктуры клеток мезофилла у хлорофиллдефектных растений *Festuca pratensis* (Poaceae). Бот. журн. 2002. (в печати).