Московская школа на Юго-Западе №1543

Изменение ориентации относительно земли соцветия *Lupinus polyphyllus* (Fabaceae) в зависимости от наличия верхушки соцветия

А. Д. Насунова (9 Б)
М. Р. Яворский (9 Б)

Научные руководители:
П. А. Волкова
Н. С. Глаголева

Москва
2023

Введение

Растения иногда получают механические повреждения, вызванные как биотическими (нападение насекомых, травоядных животных или вмешательство человека), так и абиотическими факторами (ураган, ливень или град). Чаще всего повреждения, которые приводят к изменению ориентации органов растения, приходятся на его надземные части — стебель и соцветие (Алехина и др., 2005). Изменение положения органов растений в пространстве вызывают нарушения их функций и развития, поэтому растениям важно обладать механизмами восстановления своей ориентации относительно земли.

При повреждении соцветие может изменить свое положение относительно земли, что значительно снижает успех опыления растения (Armbruster, Muchhala, 2020). Известно, что отрицательный гравитропизм у растений (способность органов растения расти против действия силы земного притяжения) зависит от статолитов, то есть пластид клетки, называемых амилопластами, которые накапливают крахмал и оседают в нижней части клеток, называемых статоцитами. Когда растение наклонено, статолиты движутся в направлении силы тяжести и запускают сигнальные процессы, вызывающие изгиб растения (Chauvet et al., 2019). Chauvet et al. (2019) исследовали гравитропизм колеоптилей пшеницы (первый зародышевый лист после семядолей) и выдвинули гипотезу, что реакция изменения положения колеоптиля происходит с задержкой, так как ауксину, который перемещается по инерции, необходимо время, чтобы прийти к клеткам колеоптиля из апикальной меристемы. Они предположили, что статоциты способны распознавать только достаточно продолжительные сигналы, вызываемые смещением статолитов, поэтому растения не изменяют свою ориентацию при кратковременных воздействиях внешних факторов на растение, например, при порывах ветра (Chauvet et al., 2019).

Известно, что ауксин стимулирует растяжение и рост клеток, и, поступая в статоциты растения, влияет на изгиб органов растения вверх из горизонтального положения за счет увеличения длины тех частей клеток, в которых его концентрация больше; на транспорт ауксина влияют непосредственно статолиты (Chauvet et al., 2019). Несмотря на это, до конца не ясно, где именно происходит синтез ауксина в соцветии: в апикальных меристемах оси соцветия или отдельных цветков (Алехина и др., 2005).

Медведев и др. (2022) исследовали соцветия *Lupinus polyphyllys* Lindl. (Fabaceae) без апикальной меристемы и с отрезанными верхними 10 см соцветия (оставались только старые и/или отцветшие цветки, так как соцветие начинает зацветать от основания), ориентировав их параллельно земле. За все время проведения эксперимента почти половина соцветий без верхних 10 см не восстановили свое положение. У соцветий контрольной группы вертикальное положение восстанавливала от половины до всей длины соцветия за 5–23 часа.

Группа соцветий без апикальной меристемы восстанавливала исходное положение не полностью (20–100% длины соцветия) за 5–23 часа. Медведев и др. (2022) предположили, что степень восстановления ориентации соцветия может быть связана с выделением ауксина не только апикальной меристемой соцветия, но и меристемой отдельных цветков. Также Медведев и др. (2022) выяснили, что у соцветий на более поздних стадиях развития восстанавливает ориентацию меньшая часть соцветия, чем у более молодых растений, и предположили, что такое изменение ориентации происходит из-за недостаточного выделения ауксина отцветшими цветками. Медведев и др. (2022) отрезали у соцветий верхние 10 см от всей длины соцветия, что могло повлиять на длину загнутой части соцветия у длинных соцветий (соцветие могло не загнуться, так как была отрезана часть соцветия, где находилась большая часть бутонов), а также измеряли отношение загнутой части соцветия ко всей длине соцветия после обрезания. Мы решили отрезать верхнюю четверть соцветия, а также измерять отношение незагнутой части соцветия ко всей исходной длине соцветия, так как нас интересовало, меняется ли место изгиба соцветия после удаления верхушки соцветия. Возможно, соцветие будет загибаться в том же месте, где загнулось бы, если бы мы его не обрезали, поскольку остается какая-то исходная «разметка» соцветия, которая не меняется из-за удаления верхушки.

В качестве объекта исследования мы выбрали *Lupinus polyphyllus* (Fabaceae), цветки которого располагаются на главной оси крупного соцветия, поэтому с ними удобно производить манипуляции. К тому же этот вид широко распространен в средней полосе России.

Цель работы:

Выяснить, как соцветия *Lupinus polyphyllus* восстанавливают исходную ориентацию относительно земли в зависимости от наличия цветков и верхушки соцветия, а также от исходной длины соцветия.

Задачи:

1) Выяснить, как влияет отсутствие верхней четверти соцветия на восстановление ориентации относительно земли.

2) Выяснить, как восстановление ориентации зависит от степени развития (длины) соцветия.

Материалы и методы

Все работы мы проводили в Ярославской области, Некоузском районе, 2 км южнее пос. Борок, на территории стационара Сунога ИБВВ РАН с 30 июня по 5 июля 2023 года. С 30 июня по 03 июля каждый день мы помечали по 12-16 люпинов (т.н. партию: табл. 1). Все люпины мы загибали с 9.30 до 12.00 (далее – утром), а фотографировали утром и с 17.30 до 20.00 (далее – вечером).

Географические координаты партий люпинов:

1 партия — 58.041571° N, 38.243259° E

2 партия — 58.041874° N, 38.242952° E

3 партия — 58.041257° N, 38.243430° E

4 партия — 58.041381° N, 38.243519° E

В каждой партии (кроме первой) мы выбирали пары люпинов с соцветиями, находящимися примерно на одной стадии развития (соцветия на более поздних стадиях развития длиннее, чем молодые соцветия, и имеют отцветшие цветки и/или бобы). В первой партии мы группировали люпины по три: с одним из соцветий мы не проводили никаких манипуляций (контроль), у второго соцветия при помощи линейки отмеряли четверть (считая от верхушки) и отрезали ее ножницами, а у третьего обрывали все цветки. Соцветия без цветков были у нас в качестве наблюдения, поэтому мы не включали их в общий статистический анализ. Во 2-4 партиях группировали люпины по два: контроль и без верхней четверти соцветия.

Таблица 1. Время постановки (П) и фотографирования (Ф) всех партий люпинов, и распределение люпинов по партиям

№ партии	состав партии	30.06 утро	30.06 вечер	01.07 утро	01.07 вечер	02.07 утро	02.07 вечер	03.07 утро	03.07 вечер	04.07 утро	04.07 вечер	05.07 утро
1	5 троек	**П, Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**					**Ф**	
2	8 пар			**П, Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**			**Ф**	
3	6 пар					**П, Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**	
4	7 пар							**П, Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**	**Ф**

Каждый люпин мы исследовали по следующему протоколу:

1. Выбираем люпин и даем ему индивидуальный номер, ставим колышек с номером на расстоянии 40 см от люпина.
2. Фотографируем номер люпина.
3. Фотографируем люпин в исходном состоянии (помещаем лист, размеченный

клеткой из квадратов со стороной 1 см за люпин (далее – палетка), выравниваем её строго вертикально по уровню, фотографируем люпин на расстоянии 40 см от него) (рис. 3)
3*. Для люпинов из экспериментальной группы отрезаем необходимую длину от верхушки соцветия или очищаем соцветия от цветов.
4. Подвязываем люпин (берём люпин и аккуратно сгибаем его, чтобы основание соцветия было параллельно земле, привязываем один конец шнура за 5-10 см от начала соцветия, а второй — к колышку и втыкаем этот колышек в землю) (рис. 4).
5. Еще раз фотографируем люпин.
6. Периодически фотографируем люпины по графику в табл. 1.

Все фото люпина мы делали камерой телефона, плоскость палетки перпендикулярна земле, палетку держим вплотную к растению, плоскость телефона при фотографировании примерно параллельна плоскости палетки.

Таким образом, каждый люпин мы сфотографировали 5 или 6 раз, всего мы сделали 393 фотографии.

Затем мы измеряли начальную длину всего соцветия и длину от начала соцветия до сгиба в каждом наблюдении по фотографиям (рис. 5) с помощью программы ImageJ. Началом соцветия мы считали точку на стебле, от которого отходит цветоножка самого нижнего цветка в соцветии. Если стебель люпина изогнулся до начала соцветия, то в качестве значения длины до сгиба мы брали отрицательную длину от точки сгиба до начала соцветия.

Мы считали отношение длины до сгиба от начала соцветия к начальной длине соцветия (далее — относительная длина незагнутой части соцветия). Чтобы оценить различия в измерениях, сделанных двумя авторами этой работы (каждое измерение было сделано одним из нас), мы отобрали 10 люпинов из разных групп, сфотографированных в разное время. Каждый из нас измерил длину незагнутой части соцветия. Различия между измерениями относительной незагнутой части соцветия двумя авторами составляют 0,5–6% (рис. 1).

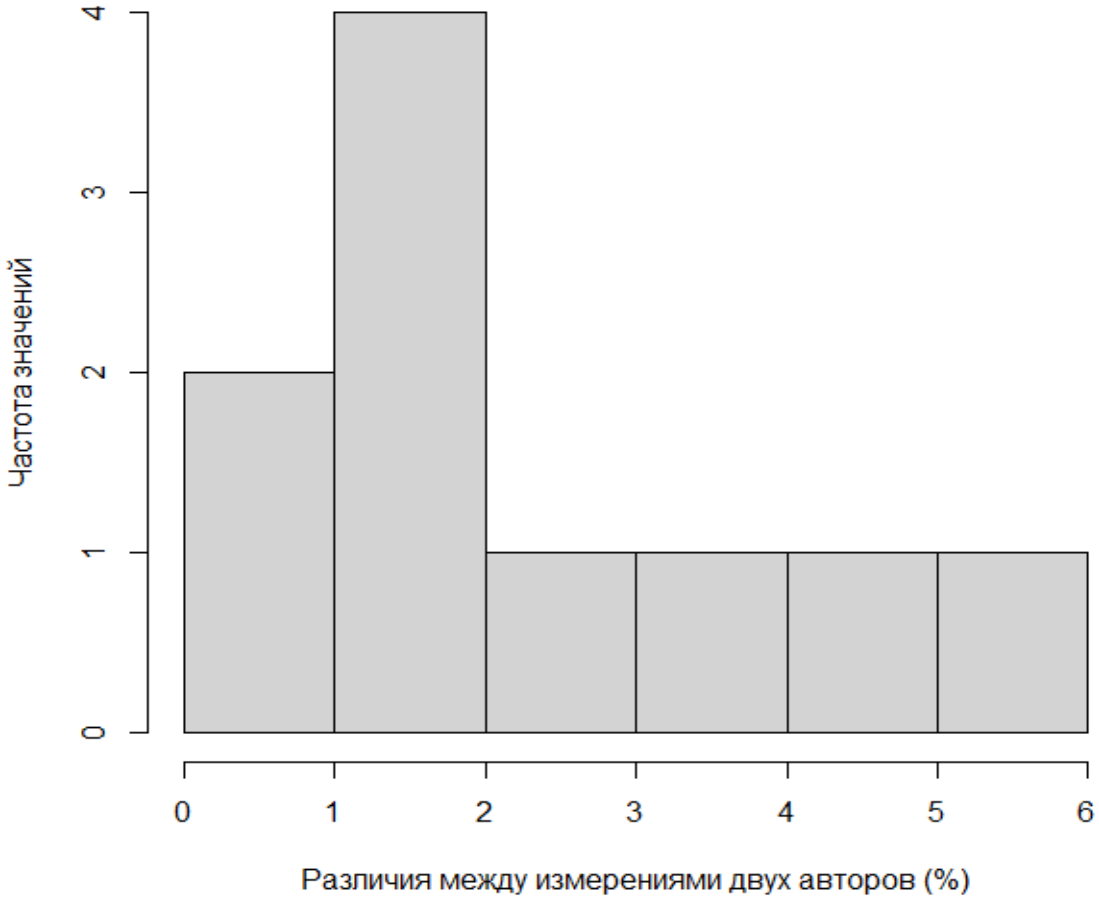


Рисунок 1. Величина различий между контрольными измерениями двух авторов работы (погрешность измерений)

Мы построили графики динамики восстановления ориентации для каждого соцветия (рис. 8, прил). В первом измерении незагнутая часть соцветия всегда равна всей длине, ведь соцветие еще не начало изгибаться, а следовательно и относительная длина незагнутой части соцветия равна 1. Чтобы оценить различия между средней относительной длиной незагнутой части соцветия (усреднена по измерениям 2–5) и относительной длиной незагнутой части соцветия в данный момент времени (отношение длины до сгиба от начала соцветия ко всей длине соцветия в момент фотографирования, далее — моментная относительная длина незагнутой части соцветия), мы построили гистограмму (рис. 2). Относительная длина незагнутой части соцветия со второго по пятого измерения изменялась по сравнению с средней относительной длиной по этим измерениям не более чем на 2%, а в единичных случаях на 4% (до 10%). Это – в пределах погрешности наших измерений (рис. 1). Поэтому для анализа динамики восстановления ориентации соцветий мы брали среднее

значение по 2-5 измерениям относительной длины незагнутой части соцветия (далее средняя относительная длина незагнутой части растения).

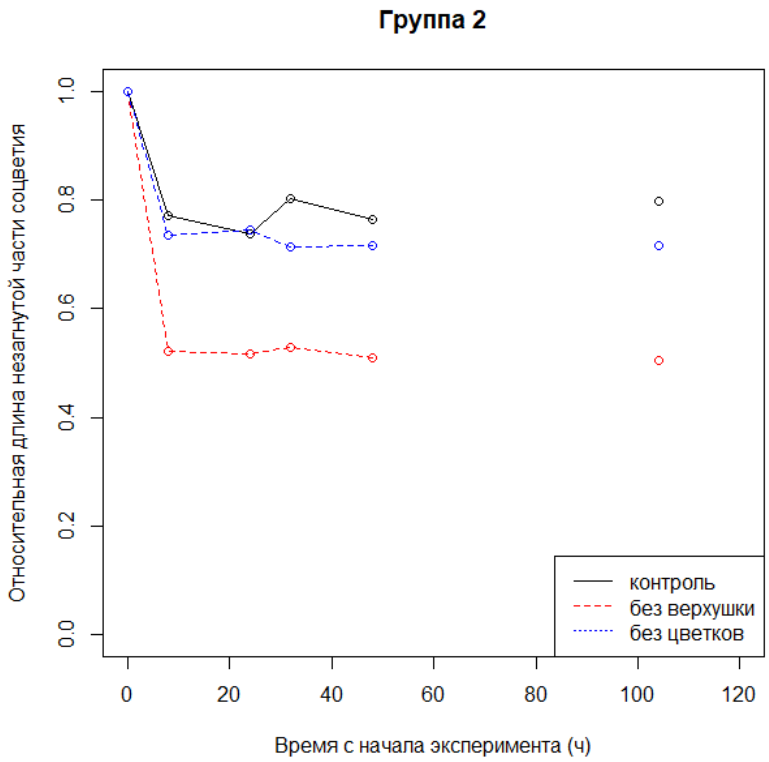


Рисунок 8. Восстановление ориентации соцветия люпина с течением времени (на примере тройки 2)

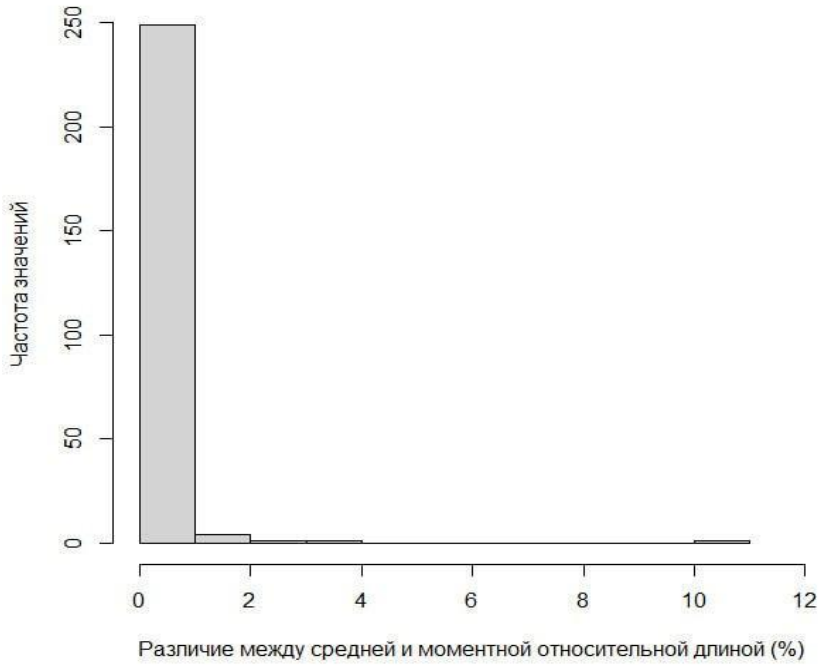


Рисунок 2. Величина различий между средней относительной длиной незагнутой и моментной относительной длиной незагнутой части соцветия

Мы построили графики зависимости относительной длины незагнутой части соцветия от начальной длины соцветия и зависимости средней длины незагнутой части соцветия от начальной длины соцветия. С помощью теста Спирмена мы проверили статистическую значимость связи между относительной длиной незагнутой части соцветия и начальной длиной соцветия. Также мы проверили тестом Вилкоксона (распределение данных на гистограммах отлично от нормального) статистическую значимость различий между выборкой средней относительной длиной незагнутой части соцветия люпинов с отрезанной верхушкой и контрольными.

Люпины с соцветиями без цветков мы не включили в общий анализ, потому что мы сфотографировали слишком малое их количество, и в ходе отработки методики мы выяснили, что они изгибаются в той же степени, что и контрольные.

Люпины группы 1 мы не учитывали при анализе данных, потому что один из них изогнулся в другой плоскости (рис. 6, 7)

Все статистические тесты и графические построения мы делали в программе R.

Рисунок 3. Люпин в исходном состоянии (из: Медведев и др., 2022)

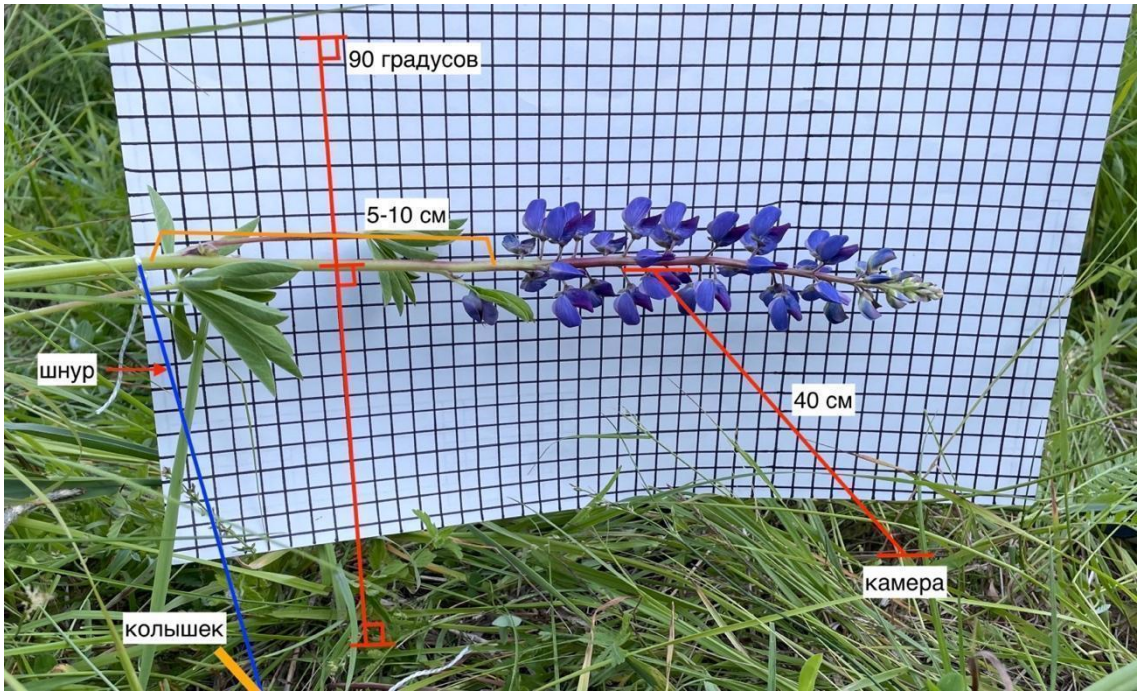


Рисунок 4. Люпин в подвязанном состоянии сразу после постановки (из: Медведев и др., 2022)

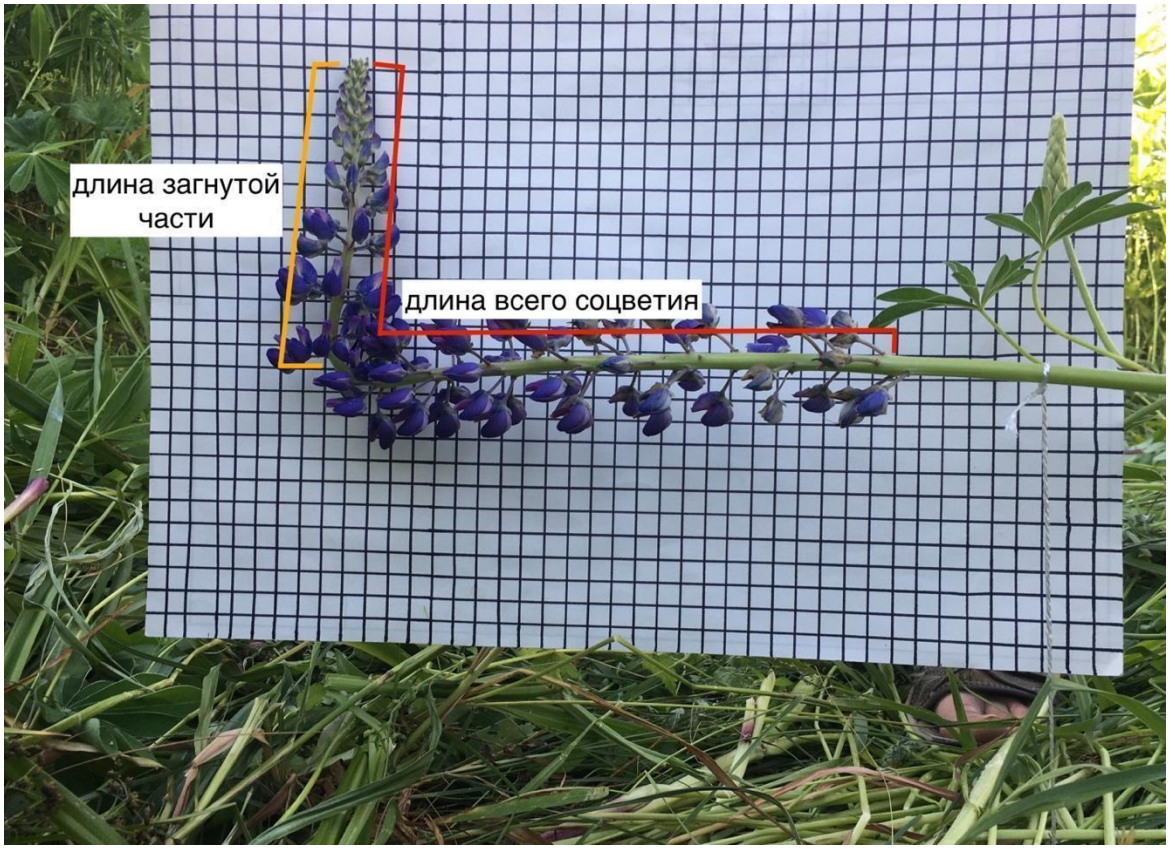


Рисунок 5. Люпин в подвязанном состоянии по прошествии некоторого времени (из: Медведев и др., 2022)

Рисунок 6. Люпин тройки №1, изогнувшийся в двух плоскостях, вид сбоку

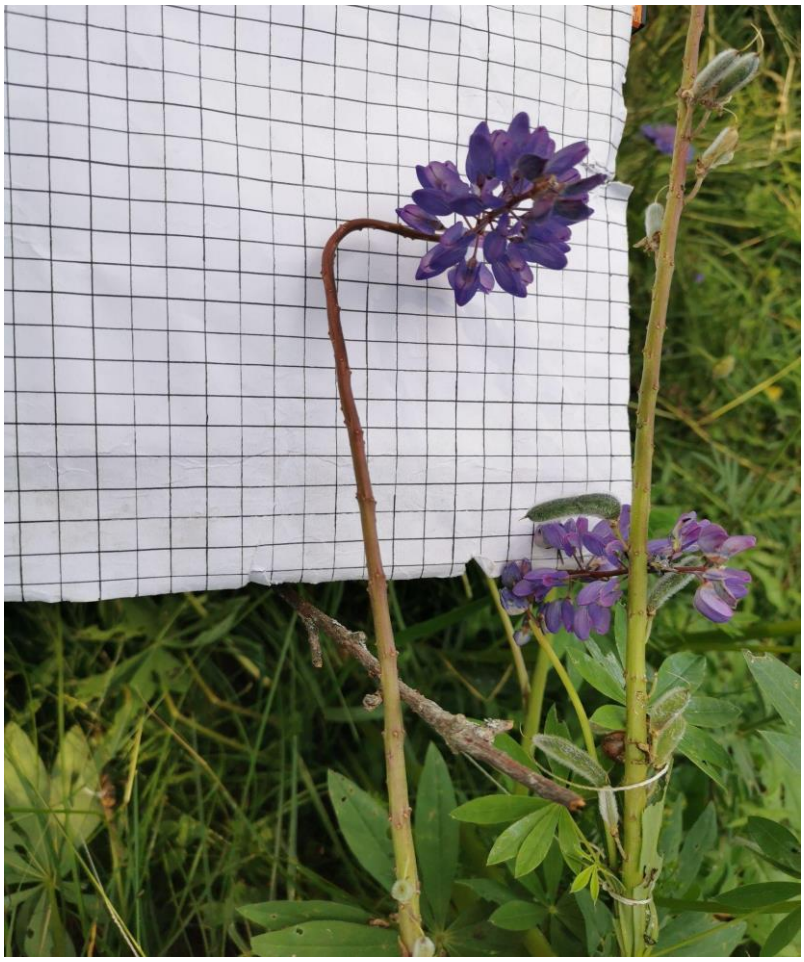


Рисунок 7. Люпин тройки №1, изогнувшийся в двух плоскостях, вид сверху

Результаты

Между средней относительной длиной незагнутой части соцветия и начальной длиной соцветия есть статистически значимая линейная положительная связь (рис. 9) как у люпинов контрольной группы (тест Спирмена: p = 0.00001, R = 0.8), так и у люпинов без верхней четверти соцветия (тест Спирмена: p = 0.0001, R = 0.7). Эта связь сохраняется даже, если брать только люпины с положительной средней относительной длиной незагнутой части соцветия, как у люпинов контрольной группы (тест Спирмена: p = 0.0002, R=0.7), так и у люпинов без верхней четверти соцветия (тест Спирмена: p=0.006, R=0.6). Хотя видно (рис. 9), что связь между средней относительной длиной незагнутой части соцветия и начальной длиной соцветия на самом деле нелинейная, подробнее мы это рассматриваем в обсуждении.

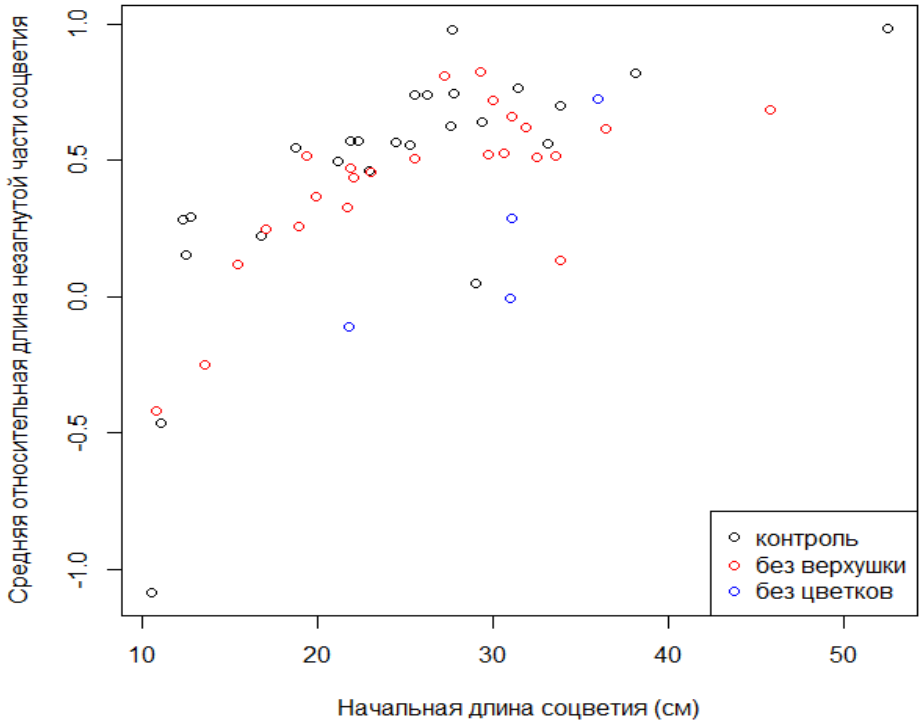


Рисунок 9. Зависимость относительной длины незагнутой части соцветия (усреднена по 2-5 измерениям) от начальной длины

Соцветия без верхушки восстанавливают свою ориентацию в той же степени, что и соцветия люпинов контрольной группы (относительная длина незагнутой части соцветия достоверно не различается: тест Вилкоксона: p = 0.16, рис. 10).

Мы заметили, что среди контрольных люпинов чаще всего доля незагнутой части соцветия была от 40% до 80%, два загнулось до начала соцветия (один за 116% длины соцветия, а второй за 46% длины соцветия, у обоих изначально все цветки были молодыми), лишь у двух соцветий доля незагнутой части составила 98% (у обоих засохших цветков и бобов было более 50%), у пяти соцветий доля

незагнутой части составила от 0 до 40% (у всех хотя бы треть цветков в начале были бутонами).

Также мы заметили, что среди люпинов без верхушки чаще всего доля незагнутой части соцветия составила от 25% до 70%, три загнулось до начала соцветия (один за 133% длины соцветия, один за 41% и один за 25%, у них в начале более половины цветков были еще бутонами), лишь у двух соцветия доля незагнутой части составила около 80% (у обоих из них в начале на соцветии было больше половины бобов и засохших цветков).

Мы заметили, что среди люпинов с оборванными цветками два соцветия загнулись до их начала (одно за 20% длины соцветия, а второе за 1% длины соцветия), у одного незагнутыми остались 28% соцветия, и у одного незагнутыми остались 73% соцветия.

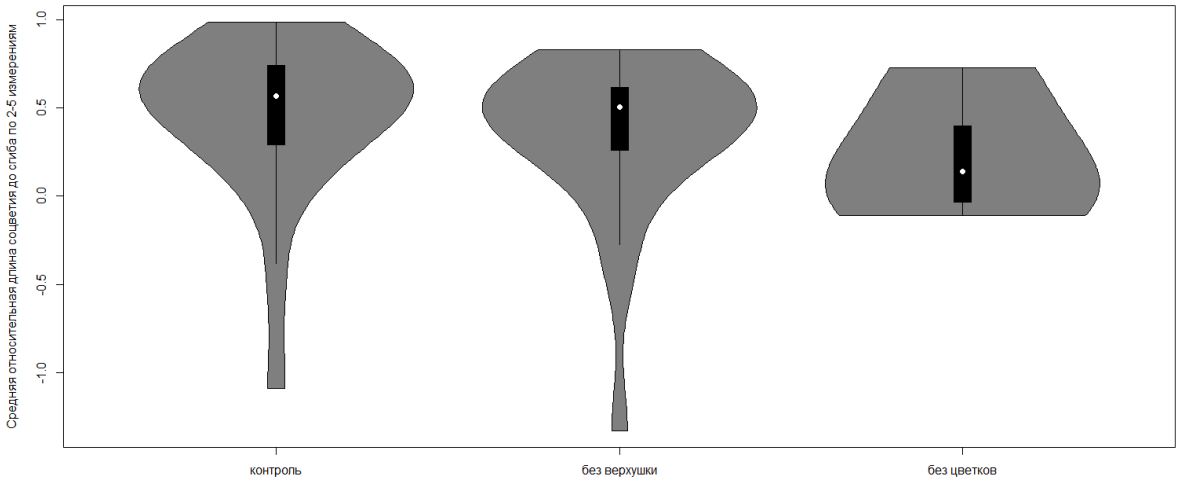


Рисунок 10. Изменчивость относительной длины незагнутой части соцветий. Ширина фигуры отображает частоту встречаемости значений, белая точка соответствует медианному значению, черный “ящик” означает нижнюю и верхнюю квартили значений, а отрезки выше и ниже ящика – размах значений без учета выбросов.

Обсуждение

Мы выяснили, что точка изгиба зависит от исходной длины соцветия, но не зависит от производимых манипуляций. Соцветия контрольной группы и без верхней четверти с приблизительно одинаковой исходной длиной соцветия восстанавливают ориентацию примерно в одинаковой степени. Исходя из этого, мы можем предположить, что точка изгиба также зависит от возраста соцветия, так как длина соцветия напрямую зависит от его возраста: чем длиннее соцветие, тем оно старше, а чем короче соцветие, тем оно моложе.

Неизвестно, где выделяется ауксин, в апикальной меристеме соцветия или в меристемах цветков (Алехина и др. 2005). Медведев и др. (2022) предположили, что апикальной меристемой соцветия ауксин выделяется не так активно, как меристемами цветков, но при этом в наших экспериментах люпины без цветков восстановили ориентацию в той же степени, как и контрольные. Можно предположить, что ауксин накапливается в растении заранее, и при изгибе стебля только перераспределяется по клеткам.

По нашим наблюдениям мы можем предположить, что люпины без цветков изгибались не столько за счет накопленного ранее ауксина, но и за счет каких-либо гравитационно-независимых механизмов (Chauvet et al., 2019). В дальнейшем можно изучить восстановление ориентации соцветий без цветков подробнее на более крупной выборке люпинов.

Люпины с соцветиями, в которых большая часть цветков еще не распустилась, загибались до начала соцветия. Возможно, это связано с тем, что эти люпины активно растут, и гормоны роста также влияют на место изгиба соцветия.

У контрольных люпинов зависимость точки сгиба от начальной длины устроена следующим образом (рис. 9): у люпинов с начальной длиной соцветия менее 20 см доля незагнутой части соцветия резко возрастает с увеличением его начальной длины (у таких люпинов нет засохших цветков или бобов), у соцветий с начальной длиной 20-30 см (у этих люпинов уже есть некоторое количество засохших цветков или бобов) эта связь становится менее четкой, а у соцветий длинее 30 см влияние длины соцветия не выявлена.

У люпинов без верхушки с начальной длиной соцветия до 30 см увеличение доли незагнутой части соцветия относительно начальной длины соцветия аналогично контрольным, а более длинные соцветия восстанавливают свою ориентацию 70-80% вне зависимости от их длины (рис. 9). Такое отсутствие соцветий люпинов без верхушки с долей незагнутой части более 80% объясняется тем, что то место, где люпин должен был изогнуться, оказалось на отрезанном участке, и потому люпин не изогнулся, а так как мы у люпинов без верхушки сравнивали длину до сгиба с начальной длиной необрезанного соцветия, то отношение получается меньше единицы. При этом доля незагнутой части составляет не 75%, а 80%, потому что люпины продолжают расти даже после того как у них обрезали верхушку. У люпинов без верхушки 75% может соответствовать любому значению от 75% до 100% у аналогичных по начальной длине контрольных люпинов.

Таким образом, можно утверждать, что чем моложе люпин, т.е. чем больше в его соцветии еще не опыленных цветков, тем большая часть его соцветия восстанавливает вертикальное положение. Если учесть, что восстановление положения необходимо для опыления, то довольно логично, что часть соцветия со старыми, уже оплодотворенными цветками не восстанавливает своего положения. Это может быть связано с более сильным одревеснением той части стебля, на которой находятся отцветающие цветы и бобы (В.В. Чуб, личное сообщение). По нашим наблюдениям, эту часть стебля гораздо сложнее согнуть, она становится менее гибкой и более жесткой, и легко ломается. В дальнейшем было бы интересно сравнить процент опыленных цветков на загнувшейся и незагнувшейся частях соцветия.

Так как основное изменение ориентации происходит за первые 8 часов, можно в дальнейшем уменьшить промежуток времени между измерениями, и посмотреть с какой скоростью и когда после загибания соцветия люпин начинает восстанавливать свою ориентацию.

Также можно согнуть соцветие на закате, для изучения влияния солнечного света на восстановление ориентации соцветия, вспышка фотоаппарата в ночное время не будет влиять на изгиб соцветия, так как механизм изгиба резистентен к недолговременным воздействиям (Chauvet et al., 2019).

Выводы

1) Отсутствие верхней части соцветия не влияет на точку изгиба соцветия.

2) Доля незагнутой части соцветия возрастает с увеличением начальной длины соцветия (с увеличением возраста соцветия), при эта связь становится менее четкой по мере увеличения возраста соцветий.

Благодарности

Мы благодарим Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН и лично его директора А.В. Крылова за предоставленную территорию стационара "Сунога" и разрешение на проведение работ, а также П.А. Волкову, С.М. Глаголева, П.Н. Петрова, Н.С. Глаголеву, Л.А. Абрамову и Е.В. Елисееву за организацию и проведение практики. Отдельно выражаем свою благодарность за рекомендации по планированию и оформлению работы П.А. Волковой, А. К. Медведеву и Н.С. Глаголевой.

Список литературы

Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. 2005. Физиология растений: Учебник для студ. Вузов. Издательский центр “Академия”. 640 с.

Медведев А.А., Радциг Е.С., Ерёмин Д.В., Чапоргина Е.А. 2022. Изменение ориентации относительно земли соцветия *Lupinus polyphyllys* (Fabaceae) в зависимости от наличия верхушки соцветия. Электронный ресурс. Режим доступа: https://bioclass.ru/wp-content/uploads/2023/09/исследовательская-работа-по-повороту-цветов-2022.pdf

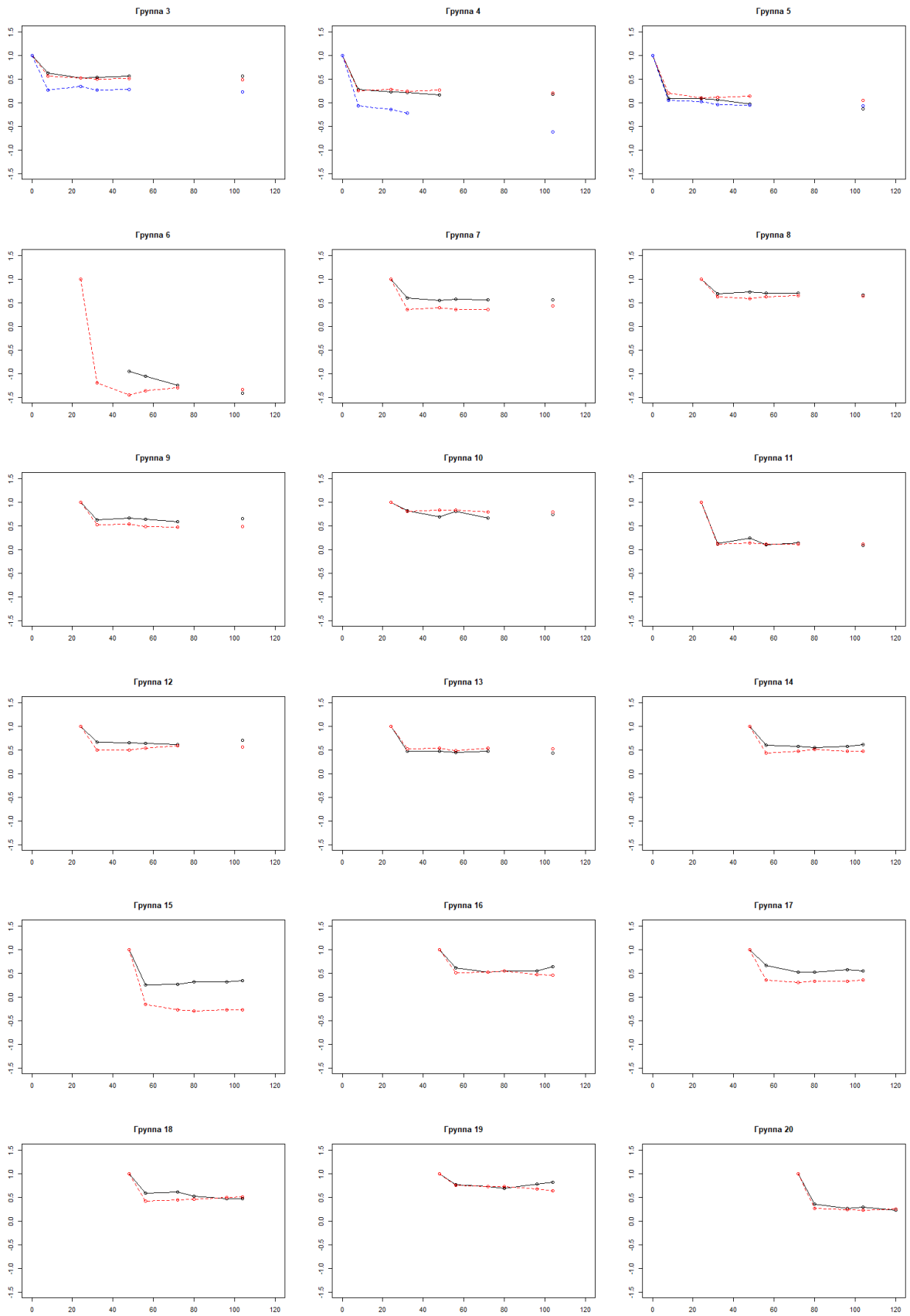
Armbruster W.S., Muchhala N. 2020. Floral reorientation: the restoration of pollination accuracy after accidents. New Phytologist. 227(1): 232–243. doi: 10.1111/nph.16482

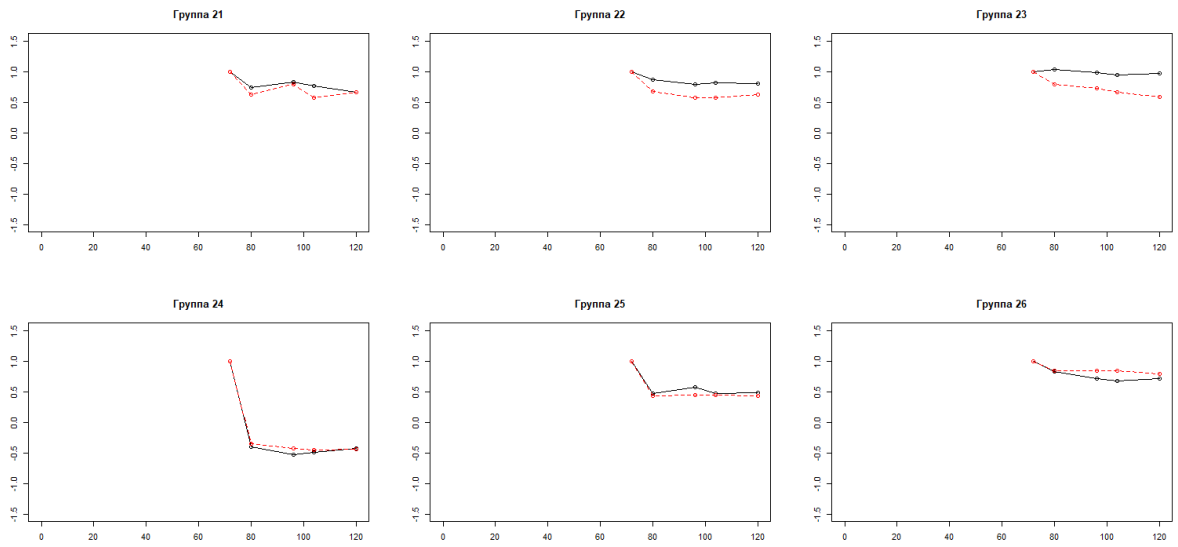
Chauvet H., Moulia B. , Legué V., Forterre Y., Pouliquen O. 2019. Revealing the hierarchy of processes and time-scales that control the tropic response of shoots to gravi-stimulations. Journal of Experimental Botany. 70(6): 1955–1967. doi:10.1093/jxb/erz027

R Core Team. 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/

Приложение

Восстановление ориентации соцветия люпина с течением времени (группы 3 - 26). По оси *x* взято время (с начала наблюдений), по оси *y* взята относительная длина незагнутой части соцветия. Сплошная черная линия — контроль, красный пунктир — люпин без верхней четверти соцветия, синий пунктир — люпин без цветков.


Группа 3
Группа 4
Группа 5
Группа 6
Группа 7
Группа 8
Группа 9
Группа 10
Группа 11
Группа 12
Группа 13
Группа 14
Группа 15
Группа 16
Группа 17
Группа 18
Группа 19
Группа 20


Группа 21
Группа 22
Группа 23
Группа 24
Группа 25
Группа 26