

Оплодотворение, эндоспермогенез и эмбриогенез *Paonia tenuifolia* L.

НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА МАРКО

СВЕТЛАНА ВАСИЛЬЕВНА ШЕВЧЕНКО

MARCO N.V., SHEVCHENKO S.V., 2008. **Fertilization, endospermogenesis and embryogenesis** *Paonia tenuifolia* L. *Chornomors'k. bot. z.*, vol. 4, N1: 76-83.

In this article, the results of the investigation of separate stages in reproductive process of the rare species *Paonia tenuifolia* L. that grown short in quantity and has protective status are given. Peculiarities of fertilization, of endosperm and embryo development are found out. Calendar terms of this process flowing in the conditions of Crimea are given. This work is illustrated by microphotographs.

Key words: *Paonia tenuifolia*, fertilization, coenocyte, endosperm, embryo

МАРКО Н.В., ШЕВЧЕНКО С.В., 2008. **Запліднення, эндоспермогенез та ембріогенез** *Paonia tenuifolia* L. *Чорноморськ. бот. ж.*, т. 4, N1: 76-83.

В даній роботі представлені результати дослідження окремих етапів репродуктивного процесу рідкісного виду *Paonia tenuifolia* L., що скорочується в чисельності і має охоронний статус. Встановлені особливості процесів запліднення, эндоспермогенеза і розвитку зародка, приведені календарні терміни їх протікання у даного виду в умовах Криму. Робота ілюстрована мікрофотографіями

Ключові слова: *Paonia tenuifolia*, сингамія, запліднення, ценоцит, эндосперм, зародок

Сохранение биоразнообразия растительного мира является одной из актуальных проблем современной ботаники. Особое внимание привлекают дикорастущие виды растений, используемые человеком в качестве лекарственных и декоративных. К таким растениям можно отнести красивоцветущий степной вид – *Paonia tenuifolia* L. (семейство Раеониасеае), естественные ценопопуляций которого стали сокращаться из-за распашки целинных степей и массового срыва его цветов на букеты. В связи с этим *P. tenuifolia* придан статус сокращающегося в численности вида, который включён в Красную книгу Украины, и в Приложение I Бернской Конвенции [ЧЕРВОНА КНИГА..., 1996; КОНВЕНЦІЯ ПРО ОХОРОНУ..., 1998].

Для выяснения возможностей семенного возобновления *P. tenuifolia* в естественных условиях произрастания в Крыму нами проводится исследование всех этапов репродуктивного процесса этого вида. В результате определено, что у *P. tenuifolia* закладка мужских и женских генеративных органов проходит в почках возобновления длиной 1,5-1,7 см, в конце октября предшествующего цветению года [МАРКО, 2004 а, 2007 а, б]. Установлено, что критическими этапами при формировании пыльцевых зерен являются мейоз и дифференцирующий митоз, приводящие к снижению количества фертильной пыльцы. В генезисе женской генеративной сферы *P. tenuifolia* значительных нарушений не выявлено. Ко времени распускания цветка мужские и женские генеративные структуры полностью сформированы и готовы к осуществлению оплодотворения, то есть для цветка *P. tenuifolia* характерна гомогамия. У данного вида наблюдаются два типа опыления: автогамия (контактная и гравитационная) и аллогамия, что осуществляется посредством энтомофилии и кантарофилии. Вследствие этого успешность опыления во многом зависит от наличия насекомых опылителей в период цветения популяции [МАРКО, 2004 б]. В данной работе

приведены результаты изучения особенностей последующих этапов репродуктивного процесса *P. tenuifolia*: оплодотворения, эндоспермо- и эмбриогенеза, возможностей прорастания семян.

Материалы и методы исследований

Материалом исследования служили особи *P. tenuifolia* ценопопуляции в окрестностях с. Лозовое Симферопольского района, которая расположена в предгорной зоне Крыма на склонах северной и южной экспозиций холмов высотой около 300 – 400 м над у.м. Для приготовления постоянных препаратов использовали общепринятые методики [ПАУШЕВА, 1988]. Фиксацию семязачатков и семян разной величины проводили смесью Карнуа (6:3:1) и фиксатором Чемберлена (90:5:5). Длительность фиксации смесью Карнуа составляла 6 часов, после чего объекты переносились в 70 % спирт. После промывки и обезвоживания фиксированный материал пропитывали хлороформом (промежуточная жидкость) и парафином по общепринятым цитоэмбриологическим методикам [РОМЕЙС, 1954; ПАУШЕВА, 1988]. Срезы выполняли толщиной 10 – 12 мкм с помощью ротационного микротомы марки МРТУ. Препараты окрашивали метиловым зелёным и пиронином с подкраской алциановым синим [ШЕВЧЕНКО, РУГУЗОВ, ЕФРЕМОВА, 1986; ПАУШЕВА, 1988; ШЕВЧЕНКО, ЧЕБОТАРЬ, 1992], время окраски для *P. tenuifolia* составляло 3–4 часа в зависимости от стадии развития. Фото получены под микроскопом JENAVAL фирмы Цейсс при использовании цифрового фотоаппарата Canon A-80.

Результаты исследований и их обсуждение

В середине мая в раскрытых цветках, венчик которых еще не опал, но тычинки уже увяли и осыпались, где длина плодолистиков составляет 10-12 мм, в семязачатках наблюдаются процессы оплодотворения. Как правило, пыльцевая трубка, содержащая ядро вегетативной клетки и два червеобразных спермия, входит в зародышевый мешок через синергиду, в которую и изливает свое содержимое. Иногда пыльцевые трубки проходят между клетками яйцевого аппарата: синергидами и яйцеклеткой (рис. 1.1).

После того, как содержимое пыльцевой трубки выходит в зародышевый мешок, спермии расходятся. Один спермий проникает в яйцеклетку и вступает в контакт с ее ядром (см. рис. 1.1), другой спермий – в центральную клетку и сближается с полярными ядрами (рис. 1.2). При этом оба спермия некоторое время сохраняют свою червеобразную форму. До оплодотворения в зародышевом мешке *P. tenuifolia* полярные ядра не сливаются, а лежат сближенными. Во время оплодотворения слияние полярных ядер со спермием происходит либо одновременно, либо последовательно: одно из полярных ядер сливается со спермием, а затем со вторым полярным ядром (см. рис. 1.2). Наши данные несколько отличаются от описания тройного слияния, приводимого М.С. Яковлевым [ЯКОВЛЕВ, ИОФФЕ, 1961] для *P. tenuifolia*, произрастающего в условиях Ленинграда. Согласно данным М.С. Яковлева, в зрелом зародышевом мешке *P. tenuifolia* полярные ядра сливаются до оплодотворения, с образованием ядра центральной клетки. Поэтому при оплодотворении у этих особей второй спермий сливается с ядром центральной клетки, мы же наблюдали иную картину.

Тройное слияние происходит несколько быстрее, чем сингамия. Раньше начинается и деление первичного ядра эндосперма, которое не сопровождается цитокинезом. Последующие деления ядер эндосперма также проходят без образования клеточных перегородок – по нуклеарному типу. Сингамия в семязачатках *P. tenuifolia* происходит по премитотическому типу (см. рис. 1.1. – 1.3), когда объединение половых ядер проходит до первого митоза зиготы [GERASSIMOVA-NAVASHINA, 1982].

В случаях, когда в семязачатке сформированы два зародышевых мешка, оба оплодотворялись (что свидетельствует о вхождении в семязачаток нескольких пыльцевых трубок). Причем, когда в зародышевом мешке, расположенном ближе к микропиле, спермий находился в контакте с ядром яйцеклетки, в зародышевом мешке, удалённом от микропиле, происходило слияние гамет (см. рис. 1.3).

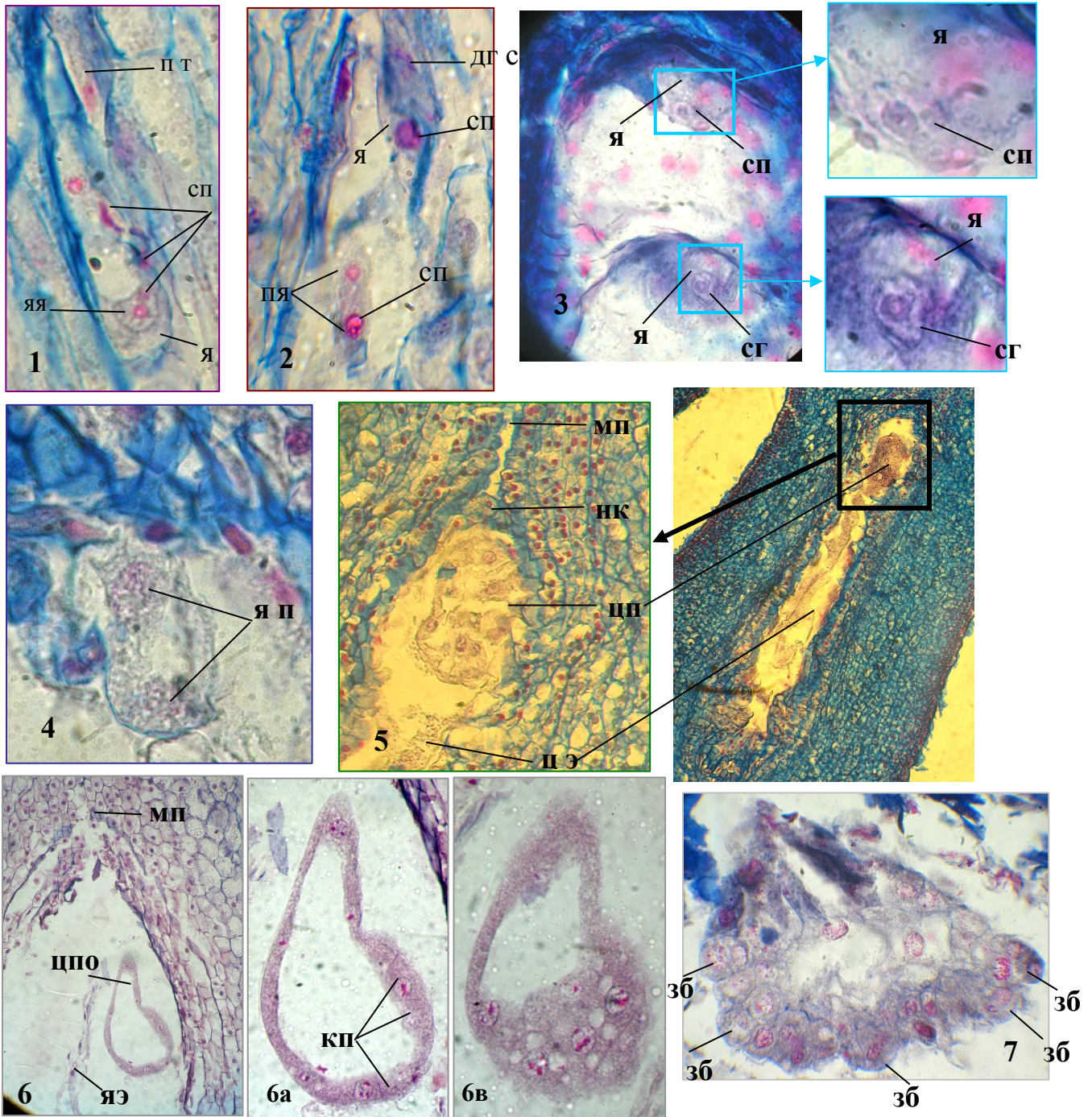


Рис. 1. Оплодотворение и начальные этапы эмбриогенеза у *P. tenuifolia*: 1-3 – процесс слияния гамет в зародышевых мешках; 4 – двуядерный предзародыш; 5 – многоядерное ценоцитное предзародышевое образование; 6 – закладка клеточных перегородок в многоядерном ценоцитном предзародышевом образовании (6а- срез центральной части при увеличении; 6в – срез микропилярной части); 7 – закладка на предзародышевом образовании 5 зародышевых бугорков (срез через срединную часть) : (сп – сперми, пт – пыльцевая трубка, я – яйцеклетка, яя – ядро яйцеклетки, пя – полярные ядра, дг с – дегенерирующая синергида, я п – ядра предзародыша, мп – микропиле, н к – нуцеллярный колпачок, цпо – ценоцитное предзародышевое образование, ц э – ценоцитный эндосперм, кп – клеточные перегородки, яэ – ядра эндосперма, зб – зародышевый бугорок)

Fig. 1. Fertilization and earlier stages of embryogenesis in *P. tenuifolia*: 1 – 3. the process of gametes blending in the embryo sac; 4 – two nuclei proembryo; 5 – multinucleis coenocyte proembryo formation; 6 – cell walls formation in the multinuclei coenocyte proembryo formation (6a- the cut of central part under enlargement; 6b – the cut of micropylar pole); 7 – formation of 5 embryo hills on proembryo formation (the cut through the central part) : (сп – sperms, пт – pollen tube, я – egg cell, яя – egg cell nucleus, пя – polan nuclei, дг с – degenerative synergid, я п – nuclei of proembryo, мп – micropyle, н к – nucellus cap, цпо – coenocyte proembryo formation, ц э – coenocyte endosperm, кп – cell walls, яэ – nucleus of endosperm, зб – embryo hill)

Зигота недолго находится в состоянии покоя, первое деление зиготы и образование дочерних ядер мы наблюдали на стадии 2 или 4-х ядерного эндосперма. В результате первого деления зиготы образуется два ядра, которые расходятся к разным полюсам клетки, и между ними образуется вакуоль (рис. 1.4). Заложение клеточной перегородки при этом не происходит, а возникает двуядерный ценоцит подобный тому, что формируется у других видов этого рода (*P. anomala*, *P. officinalis*, *P. wittmania*, *P. lactiflora*) [ЯКОВЛЕВ, ИОФФЕ, 1957, 1961, 1965; TIAGI, 1970].

Наличие данной стадии эмбрионального развития мы наблюдали в семязачатках *P. tenuifolia* длиной 1,8 – 2,0 мм и шириной 0,5 мм, после отцветания и опадания венчика цветка в плодолистиках длиной 12-13мм (в 3-й декаде мая). В результате второго деления двуядерного ценоцитного предзародышевого образования, при котором оба ядра делятся синхронно, образуется четырёхядерный ценоцит. Последующие генерации свободного деления ядер приводят к формированию многоядерного ценоцитного образования (рис. 1.5). Оно имеет сферическую или удлинённо грушевидную форму с полостью внутри образованной крупной вакуолью, а цитоплазма с ядрами образуют пристеночный слой. Подобное ценоцитное образование было отмечено у *P. anomala* [ЯКОВЛЕВ, ИОФФЕ, 1961].

Исследователи по-разному называли сформированную после делений зиготы ценоцитную структуру. Одни авторы обозначают её как проэмбрио [CAVE, ARNOTT, COOK, 1961], другие называют её суспензором [MURGAI, 1959]. Мы присоединяемся к мнению М.С. Яковлева и М.Д. Иоффе [ЯКОВЛЕВ, ИОФФЕ, 1961], которые предложили обозначить данную структуру как «предзародышевое образование», так как этот термин больше соответствует её функции.

Закладка клеточных перегородок в предзародышевом ценоцитном образовании *P. tenuifolia* наблюдается в плодолистиках размером 14-17 мм, в семязачатках длиной 3,5-4,0 мм и шириной 1,5-2,0 мм. Перед заложением клеточных перегородок в цитоплазме ценоцита предзародышевого образования происходят некоторые изменения. Из гомогенной с большой вакуолью в центре она становится более вакуолизированной, по периферии вокруг ядер в ней образуются маленькие вакуоли, а впоследствии между ядрами закладываются клеточные перегородки (рис. 1.6). В ядерном эндосперме в это время также происходит закладка клеточных перегородок.

Заложение клеточных перегородок и формирование клеток в предзародышевом образовании *P. tenuifolia* происходит в двух направлениях:

- 1) в базипетальном – первыми закладываются перегородки на апикальном конце предзародышевого ценоцитного образования, а затем на базальном (см. рис. 1.6);
- 2) в центростремительном – от периферии к центру происходит постепенное нарастание клеток вследствие интенсивно идущих клеточных делений (рис. 1.7).

В конце мая – начале июня в плодолистиках размером 25-30 мм, в семязачатках длиной 5-6 мм и шириной 2,5-3 мм происходит дифференциация зародышевых бугорков. Зародышевые бугорки возникают в апикальной части клеточного предзародышевого образования вследствие интенсивных делений периферических клеток (см. рис. 1.7).

В эндосперме в это время ценоцитная фаза сменяется клеточной. Причем переход в клеточное состояние в разных частях эндосперма происходит неодновременно, в результате чего в эндосперме некоторое время видны и свободнаяядерные и клеточные зоны (рис. 2). Направление заложения клеточных перегородок в эндосперме происходит от микропилярного полюса к халазальному, от периферии ценоцита к его центру (см. рис. 2).

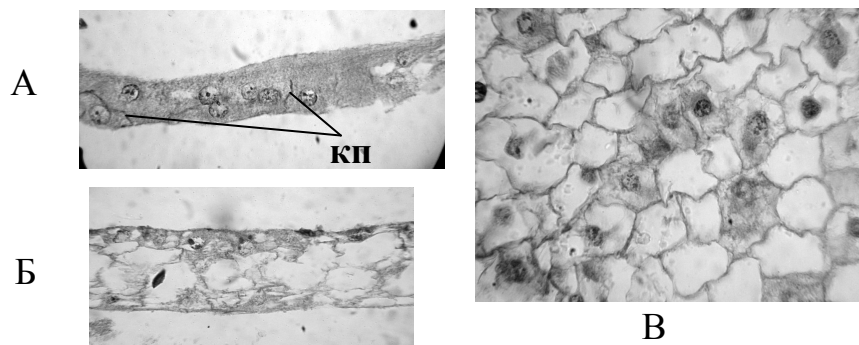


Рис. 2. Фрагменты эндосперма *P. tenuifolia*: переход от свободнойядерной стадии в клеточную (А – эндосперм в халазальной зоне семязачатка, Б – в латерально-халазальной зоне, В – в микропиллярной зоне).

Fig. 2. Endosperm fragments of *P. tenuifolia*: transition from free-nuclei stage to cellular stage (А – endosperm in the chalazal zone of ovule, Б – in the lateral-chalazal zone, В – in the micropylar zone).

В конце первой декады июня (в семенах размером 7,0-8, 5 мм длиной и 3, 0-3,3 мм шириной) на предзародышевом образовании из зародышевых бугорков асинхронно развиваются зародыши (рис. 3).

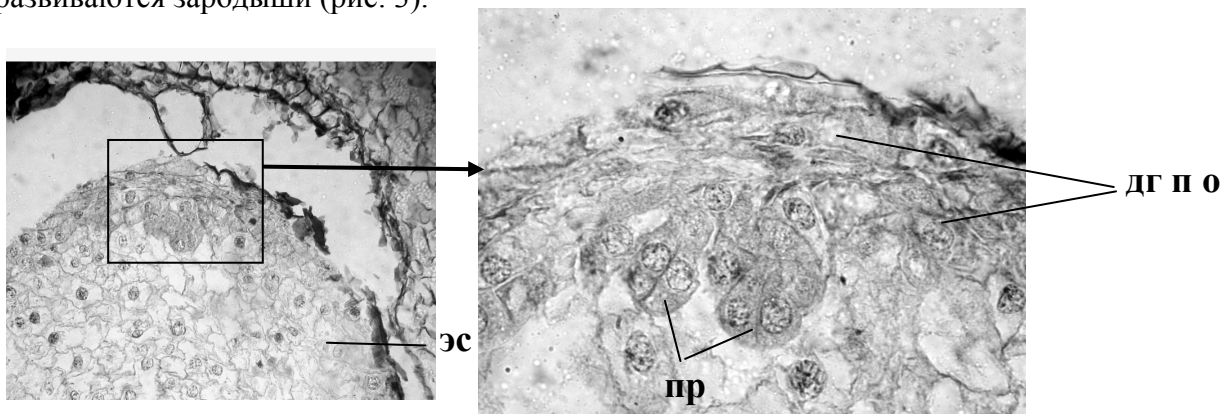


Рис. 3. Асинхронное развитие на предзародышевом образовании *P. tenuifolia* нескольких проэмбрио (дг по – дегенерация клеток предзародышевого образования, пр – проэмбрио, эс – эндосперм).

Fig. 3. Asynchronous development of some proembryos on proembryo formation (дг по – degeneration of proembryo formation cells, пр – proembryo, эс – endosperm).

В этот период основная часть клеток предзародышевого образования уплотняется, сжимается, в них наблюдаются процессы дегенерации (см. рис. 3, рис. 4).

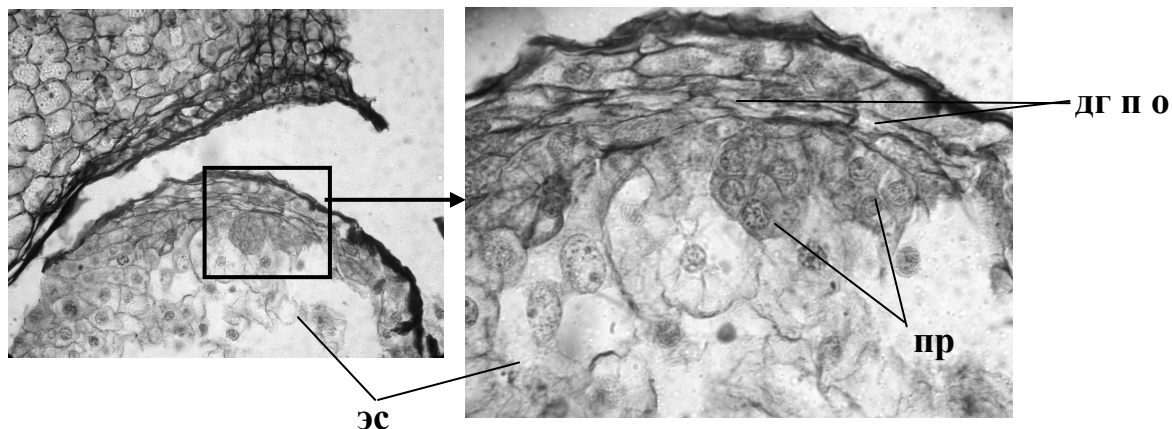


Рис. 4. Дегенерация предзародышевого образования *P. tenuifolia* и развитие 1-2 зародышей

Fig. 4. Degeneration of proembryo formation in *P. tenuifolia* and 1-2 embryos' development.

Развитие и дальнейшая дифференциация некоторых проэмбрио в процессе формирования семени приостанавливается. Из множества зародышевых бугорков и проэмбриональных зародышей, обычно возникающих на предзародышевом образовании, только один (редко два) развивается и дифференцируется на органы и ткани (рис. 5).

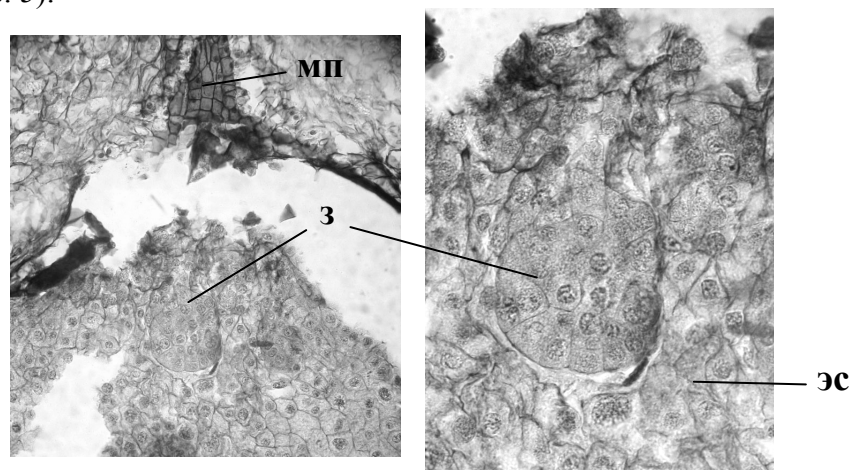


Рис. 5. Глобулярный зародыш *P. tenuifolia* (з – зародыш).

Fig. 5. Globular embryo *P. tenuifolia* (з – embryo).

По мере роста формирующегося зародыша уменьшается и уплощается предзародышевое образование, на котором этот зародыш возник. По мнению М.С. Яковлева и М.Д. Иоффе [ЯКОВЛЕВ, ИОФФЕ, 1957,1961], предзародышевое образование является источником, из которого формирующийся зародыш получает питательные вещества.

В зрелом семени *P. tenuifolia* (конец июня - первая декада июля) зародыш полностью дифференцирован и состоит из эпикотилия, гипокотилия и семядолей (рис. 6).

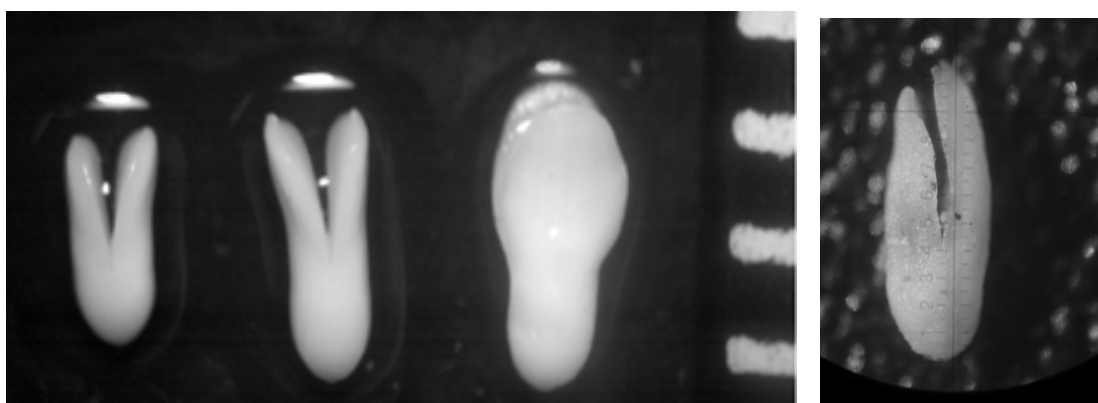


Рис. 6. Зародыши из опавших семян *P. tenuifolia* (2007 г.).

Fig. 6. Embryos from fallen seeds of *P. tenuifolia* (2007).

Эндосперм мощный, окружает зародыш, имеет в центре щель. Соотношение размера эндосперма к размеру зародыша составляет 3:1. Все морфологически нормальные семена *P. tenuifolia* имеют дифференцированный зародыш (см. рис. 6). В некоторых семенах наблюдалось образование двух дифференцированных зародышей одного размера.

Результаты проращивания семян *P. tenuifolia* в лабораторных условиях показали их высокую всхожесть: 80-90 %, которая по истечении 2-х лет хранения (при t 18-20° С и относительной влажности 45) снижается незначительно, до 65-70 %. Свежесобранные семена *P. tenuifolia* (июль) при посеве в чашки Петри проросли только в середине февраля (через 4,5-5 месяцев). После хранения семян этого же года сбора в течение 4,5-5 месяцев, они прорастали через 2-3 недели. Эти данные свидетельствуют о наличии у семян *P. tenuifolia* периода физиологического покоя.

Выводы

Таким образом, процессы оплодотворения, эндоспермо- и эмбриогенеза у *P. tenuifolia* характеризуются следующими чертами. Данному виду свойственна порогамия; при этом в один семязачаток может входить несколько пыльцевых трубок и оплодотворять несколько зародышевых мешков. Сингамия премитотического типа, тройное слияние опережает сингамию. Эндосперм нуклеарного типа. Формирование зародыша *P. tenuifolia* происходит по Раеoniad-типу, в течение довольно длительного времени (45 - 55 дней). Эмбриогенез включает в себя две последовательных стадии морфологически и функционально различающиеся, однако, способствующие формированию полноценного зародыша. Опадающие в I-II декаде июля семена *P. tenuifolia* содержат дифференцированный зародыш и обладают физиологическим покоем. Результаты исследования позволяют предположить, что семена *P. tenuifolia* способны создавать семенной банк в почве и не терять свою всхожесть по истечению 2-3 лет.

Список литературы:

- КОНВЕНЦІЯ ПРО ОХОРОНУ ДИКОЇ ФЛОРИ І ФАУНИ ТА ПРИРОДНИХ СЕРЕДОВИЩ ІСНУВАННЯ В ЄВРОПІ (БЕРН, 1979). – К., 1998. – 76 с.
- МАРКО Н.В. Генеративна сфера *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae) // Наукові основи збереження біотичної різноманітності: Тематичний збірник інституту екології Карпат НАН України. – Львів, 2004. – Вип. 6. – С. 85-86.
- МАРКО Н.В. Антэкологія і семенна продуктивність *Paeonia tenuifolia* L (Paeoniaceae) в Криму // Вісник Запорізького державного університету. Біологічні науки. – 2004. – № 1. – С. 136-140.
- МАРКО Н.В. Женская генеративная сфера *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae) // Вісник КНУ ім. Т.Г. Шевченко. Інтродукція та збереження рослинного різноманіття.– 2007. – Вип. 14. – С. 145-152.
- МАРКО Н.В. Развитие мужской генеративной сферы *Paeonia tenuifolia* L. // Читання присвячені 300-річчю з дня народження К. Ліннея. Луганськ, 21-25 травня 2007 р. – Луганськ, 2007. – С. 54-56.
- ПАУШЕВА З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
- РОМЕЙС Б. Микроскопическая техника. – М., 1954. – 718 с.
- ЧЕРВОНА КНИГА УКРАЇНИ. Рослинний світ / Під.ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонка. – К.:Українська енциклопедія, 1996. – 602 с.
- ШЕВЧЕНКО С.В., РУГУЗОВ И.А., ЕФРЕМОВА Л.М. Методика окраски постоянных препаратов метиловым зелёным и пиронином // Бюл. Никит. ботан. сада.– 1986. – Вып. 66. – С. 99-101.
- ШЕВЧЕНКО С.В., ЧЕБОТАРЬ А.А. Особенности эмбриологии маслины европейской (*Olea europaea*) // Цитолого-эмбриологические исследования высших растений. Труды Никит. ботан. сада. – 1992. – Т.113. – С.52-61.
- ЯКОВЛЕВ М.С., ИОФФЕ М.Д. Особенности эмбриогенеза рода *Paeonia* L. // Ботанический журнал. – 1957. – Т. 42, № 10. – С. 1491-1502.
- ЯКОВЛЕВ М.С., ИОФФЕ М.Д. Дальнейшее изучение нового типа эмбриогенеза покрытосеменных // Ботанический журнал. – 1961. – Т.46, № 10. – С. 1402-1421.
- ЯКОВЛЕВ М.С., ИОФФЕ М.Д. Эмбриология некоторых представителей рода *Paeonia* L. // Морфология цветка и репродуктивной фазы у покрытосеменных растений / Под. ред. М.С. Яковлева. – М.-Л., 1965. – С. 140-176.
- CAVE M.S., ARNOTT H.J., COOK S.A. Embryogeny in the California peonies with reference to their taxonomic position // American Journal Botany. – 1961. – № 48. – P. 397-404.
- GERASSIMOVA-NAVASHINA H. Process of double fertilization in angiosperms and mitotic cycle of the cell // Phytomorphology. – 1982. – Vol. 32, № 1-3. – P. 222-233.

- MURGAI P. The development of the embryo in *Paeonia* – a reinvestigation // Phytomorphology. – 1959. – V.9, № 3. – P. 275-277.
- TIAGI Y.D. Paeoniaceae // Bulletin of the Indian National Science Academy. – 1970. – № 41. – P. 45-52.
- YAKOVLEV M.S., YOFFE M.D. On some peculiar features in the embryology of *Paeonia* // Phytomorphology. – 1957. – Vol. 7, № 1. – P. 74-82.

Рекомендує до друку
В.Д. Работягов

Отримано 05.05.2008 р.

Адреси авторів:

Н.В. Марко, С.В. Шевченко
Нікітський ботанічний сад – Національний
науковий центр УААН, с.м.т. Нікіта, м. Ялта,
98648, АР Крим,
Україна
e-mail: nataly-marko@rambler.ru

Autor's address:

Marco N.V., Shevchenko S.V.
The Nikita Botanical Garden – National Scientific
Center UAAS,
Nikita, Yalta, 98648, Crimea,
Ukraine
e-mail: nataly-marko@rambler.ru