УКРАЇНСЬКИЙ
БОТАНІЧНИЙ
ЖУРНАЛ

А.Ф. ПОПОВА, Г.Ф. ІВАНЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, Київ, 01601, Україна
cell@svitonline.com

РАННІ СТАДІЇ ЕМБРІОГЕНЕЗУ У ПОВІТРЯНО-ВОДНОЇ ТА СУХОДІЛЬНОЇ ФОРМ *SIUM LATIFOLIUM* L. (*UMBELIFERAE*)

Ключові слова: ембріогенез, Sium*, водний дефіцит*

Вступ

Відомо, що різні стадії репродуктивного розвитку рослин зазнають впливу водного дефіциту, який, гальмуючи обмін речовин внаслідок підвищення вмісту етилену і рівня абсцизової кислоти, призводить до аномалій у процесі формування гамет і зародкових мішків, і, зрештою, до зниження продуктивності рослин загалом [3]. Тому вважають [4], що розвиток насіння є найбільш чутливим до водного стресу, бо в цих умовах виникають численні аномалії у процесі формування насіння і плодів, зокрема зменшуються кількість і розмір колосків, хоча реакція різних сортів на дефіцит вологи відрізняється [5]. Експериментами на ізольованих зародках показано, що водний режим зав'язі безпосередньо впливає на формування зернівки, причому кількість зерен передусім залежить від швидкості руху асимілятів до зав'язі [13].

Під впливом водного стресу рівень полісахаридів у рослин змінюється. Було показано [11], що концентрація глюкози та сахарози зменшувалася за умов водного

© А.Ф. ПОПОВА,
Г.Ф. ІВАНЕНКО, 2006

дефіциту внаслідок зниження активності крохмаль- та АДФГ-синтезуючих ферментів, починаючи з 7-ї доби після запилення рослин і до 13-добового віку. При цьому хоча сира вага ендосперму збільшувалася протягом вказаного часу, проте суттєвої різниці між контрольними рослинами і тими, що зазнавали водного дефіциту, за цим показником не було. Встановлено [15], що формування насіння у рослин дослідного варіанта супроводжується змінами темпів розвитку зародків, що може впливати на якість насіння, а в цілому — і на продуктивність рослини. Спостерігалися також зміни у білковому синтезі, зокрема поява специфічних білків. Деякі з них виконують захисну функцію за умов водного стресу [8, 16].

Тому вивчення розвитку зародків у рослин за різного водного режиму є важливим для з'ясування як закономірностей ембріогенезу, так і темпів його перебігу. Нашою основною метою було дослідження особливостей ембріогенезу *Sium latifolium* L. (*Umbeliferacea*) на ранніх стадіях формування зародків у рослин, які перебували в умовах різного водного режиму. Розвиток зародків вивчали до 15-добового віку, коли в них ще не починалася диференціація сім'ядолей.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктом дослідження були повітряно-водні та суходільні рослини *Sium latifolium* L., які росли у воді та по берегах р. Псел (Полтавська обл.), проте за висотою рослин обидві форми істотно не відрізнялися. Загальна зволоженість ґрунту, на якому знаходилися повітряно-водні рослини у періоди бутонізації та плодоутворення, становила, відповідно, 39,8±0,9 і 39,5±0,4 %, тимчасом як для суходільних рослин у ці ж періоди росту показники вмісту води були нижчими — 26,3±0,3 і 24,4±0,6 %.

Для порівняльних цитоембріологічних досліджень відбирали зонтики, що формувалися в суцвітті першими. З метою чіткої ідентифікації віку насіннєвих зачатків і зародків повітряно-водних та суходільних рослин *Sium* квітки маркували. Враховуючи, що досліджувані квітки актиноморфні, для них є характерною протандрія, котра забезпечує перехресне запилення, маркування здійснювали без попередньої кастрації пиляків кольоровими нитками. Для маркування і подальшої фіксації відбирали лише квітки зовнішнього ряду зонтиків — більші за розмірами порівняно з іншими квітками суцвіття.

Для ембріологічного дослідження насіннєві зачатки в зав'язях різного віку фіксували за Навашиним, а також сумішшю 2,5 %-го розчину глютарового альдегіду та 1,5 %-го розчину параформальдегіду на 0,05 М фосфатному буфері з pH 7,0. Залежно від товщини зрізів, необхідних для досліджень, матеріал після зневоднення вміщували у парапласт або епоксидні смоли. Зрізи завтовшки 10 мкм виготовляли за допомогою санного мікротома, напівтонкі — товщиною до 3 мкм — ультрамікротома MT-XL (Boeckeler Instruments, США).

Зрізи фарбували основним фуксином із підфарбовуванням світлим зеленим (за Модилевським) і толуїдиновим синім [2].

Накопичення запасних поживних речовин аналізували за допомогою гістохімічних реакцій. Локалізацію полісахаридів виявляли із застосуванням ШИК-реакції, білків — анілінового чорно-синього [12]. Зрізи вивчали в мікроскопі NF (Karl Zeiss, Німеччина) і фотографували за допомогою мікроскопів Аксіоскоп та Stemy-6V (Karl Zeiss, Німеччина).

Результати досліджень та їх обговорення

Суцвіття *Sium* — це складний зонтик, утворений з кількох простих. Центральний зонтик суцвіття має суттєво більші розміри порівняно з іншими, які формуються на стеблі. Зонтики повітряно-водних рослин *Sium* є більшими, ніж суходільних. Так, діаметр зонтика у повітряно-водних рослин на стадії цвітіння в середньому становив 6,5—7,0 см, а зі сформованими мерикарпіями — 8,1—8,2 см, тоді як у суходільних — 5,5—6,0 см та 7,0—7,1 см, відповідно. Складний зонтик містить до 14—17 простих, кожен з яких несе по 12—15 квіток. За кількістю сформованих зонтиків рослини чітко не відрізняються.

Квітки у видів *Sium* двостатеві, 5-членні. Досліджували крайні квітки зонтиків, що першими формувалися в суцвітті, зважаючи, що вони трохи більші і вирівняні за розмірами порівняно з центральними. Розмір квіток суходільних рослин менший (діаметр 3 мм) порівняно із повітряно-водними (діаметр 4 мм). Як повітряно-водні, так і суходільні рослини мали білу оцвітину. Проте структура поверхні пелюсток квіток повітряно-водних і суходільних рослин відрізняється. Методом скануючої мікроскопії виявлено рельєфніший характер поверхні пелюсток суходільних рослин внаслідок наявності більш загострених горбочків — у повітряно-водних рослин вони сильніше закруглені, можливо, в результаті підвищеної гідратації клітин через активацію водних каналів, як було показано для *Dictyostelium* при водному стресі [7]. Колір зрілих пиляків рослин обох екотопів відрізняється. Зокрема, у повітряно-водних вони мають світло-бузковий відтінок навіть у напівроскритих квітках, а в суходільних — білого кольору.

Гінецей у видів *Sium* синкарпний, складається з двох плодолистків. Зав'язь нижня, двогнізда, внаслідок розростання її верхівки формується стилоподій — так званий нектарний, або залозистий диск (рис. 1, *а*, *б*), клітини якого виділяють нектар, у такий спосіб приваблюючи комах, сприяють перехресному запиленню. За розміром стилоподію на стадії цвітіння повітряно-водні рослини переважають суходільні. Край стилоподію у суходільних рослин має більш звивистий контур і зберігає таку форму і в подальшому у процесі формування мерикарпіїв.

У кожному гнізді зав'язі закладається по два насіннєві зачатки, проте внаслідок дегенерації одного з них розвивається лише нижній, тобто плід містить два мерикарпії. Аналіз зрізів зав'язей показав, що на момент маркування квіток насіннєві зачатки містили сформовані зародкові мішки *Polygonum*-типу з усіма їхніми елементами. Через 2 доби після маркування у зародкових мішках відзначалися зиготи, або 2-клітинні проембріо (рис. 1, *б*),

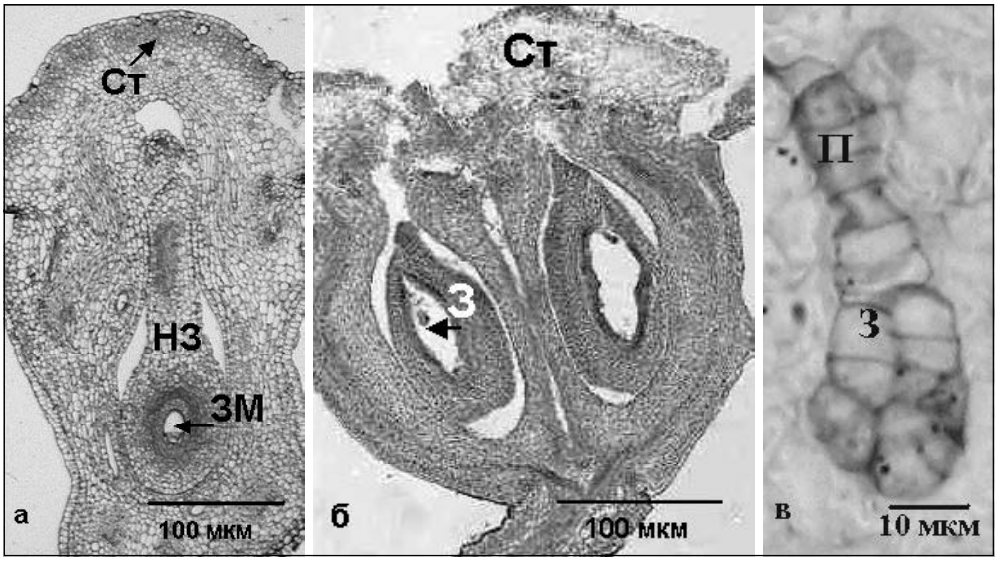

Рис. 1. Зав'язі, насіннєві зачатки на різних стадіях розвитку та зародок *Sium latifolium* L. (*а* — до цвітіння; *б* — через 2 доби після маркування квіток; *в* — 4-добовий зародок): НЗ — насіннєвий зачаток; ЗМ — зародковий мішок; Ст. — стилоподій; З — зародок; П — підвісок

Fig. 1. Ovary, ovules at different stage development and embryo of *Sium latifolium* L. (*а* — before flowering; *б* — two days after marking; *в* — 4 day old): НЗ — ovule; ЗМ — embryo sac; Ст — stylopodium; З — embryo; П — suspensor

та пристінний тонкий шар ядерного ендосперму, котрий налічував до 12 ядер. Клітиноутворення починалося з апікальної частини зародкового мішка. Отже, ендосперм у видів *Sium* розвивається за ценоцитним типом.

Перший поділ зиготи у видів *Sium* відбувається у поперечному напрямку. На цей час зародковий мішок значно збільшується і вже містить численні ядра ендосперму. Зародок розвивається за *Solanad*-типом, згідно з яким сформовані апікальна та базальна клітини дають початок власне зародку та підвіску.

На 4—5 добу після маркування квіток у зародкових мішках як повітряно-водних, так і суходільних рослин спостерігалися дрібні зародки округлої форми (4—8-клітинні) з коротким однорядним, як правило, 4-клітинним підвіском (рис. 1, *в*). Розміри зародків суходільних і повітряно-водних рослин майже не відрізнялися (рис. 2, *а*, *б*). На цей час ендосперм інтенсивно розвивався і поступово заповнював порожнину зародкового мішка (рис. 3, *а*). Проте слід відзначити, що в окремих насіннєвих зачатках вміст одного із зародкових мішків зазнавав різного рівня дегенерації, оскільки не розвивалися зародки (рис. 3, *б*).

Зі збільшенням розміру насіннєвих зачатків через 6—7 діб від моменту маркування квіток як у повітряно-водних, так і суходільних рослин зародки дещо збільшувалися, проте були досить дрібними (до 8—10 мкм на поперечному зрізі), водночас їх підвіски подовжувалися за рахунок поділу клітин у поперечному напрямку. Через 7—8 діб після маркування багатоклітинні за-

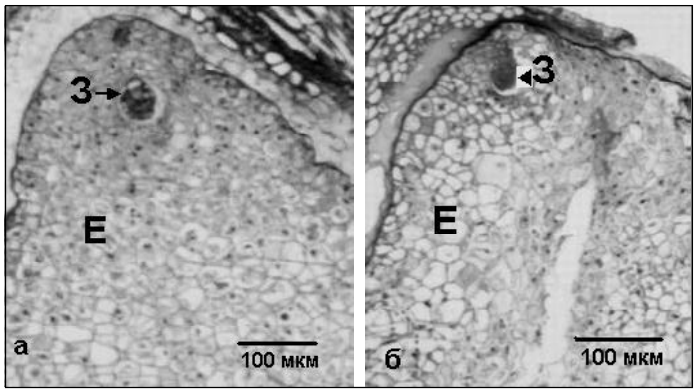

Рис. 2. Зародки *S. latifolium,* 5 діб після маркування квіток: *а* — суходільні, *б* — повітряно-водні рослини; З — зародок; Е — ендосперм

Fig. 2. Embryos of *S. latifolium,* 5 days after flower marking: *а* — terrestrial plants; *б* — aerial-aquatic plants; З — embryo; Е — endosperm

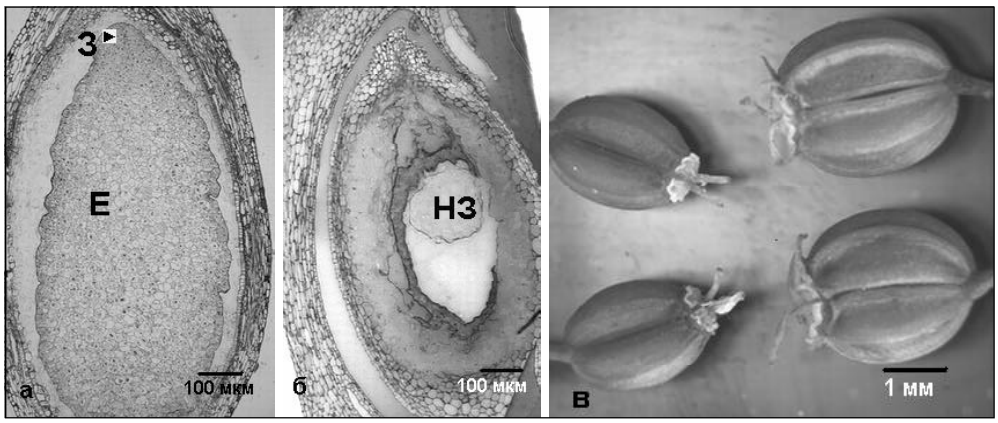

Рис. 3. Зародкові мішки, 5 діб після маркування квіток (*а*, *б*) та 15-добові мерикарпії (*в*) *S. latifolium* (зліва — суходільна форма, справа — повітряно-водна): *а* — зародковий мішок з ендоспермом та зародком; *б* — дегенерація вмісту зародкового мішка; *в* — 15-добові мерикарпії; З — зародок; Е — ендосперм; ЗМ −зародковий мішок

Fig. 3. Embryo sacs, 5 days after marking (*а*, *б*) and 15-days-old mericarpium (*в*) of *S. latifolium* (at the left are the terrestrial plants; at the right are the aerial-aquatic plants): *а* − embryo sac with embryo and endosperm (5 days after flower marking); *б* − degeneration embryo sac; *в* — 15-days-old mericarpiums: З — embryo; Е — endosperm; ЗМ — embryo sac

родки у рослин обох екотипів набували округлої форми, а насіннєві зачатки значно збільшувалися. При цьому навколо зародків поступово формувалася зона із напівзруйнованих та повністю зруйнованих клітин ендосперму, які зазнавали лізису. Внаслідок інтенсивного розвитку ендосперму він поступово заповнював майже весь об'єм зародкових мішків.

Цитоембріологічний аналіз 8—9-добових насіннєвих зачатків обох екотипів рослин *Sium* засвідчував наявність у зародкових мішках кульоподібних зародків із ниткоподібними підвісками (рис. 4). Останні, як правило, скла-

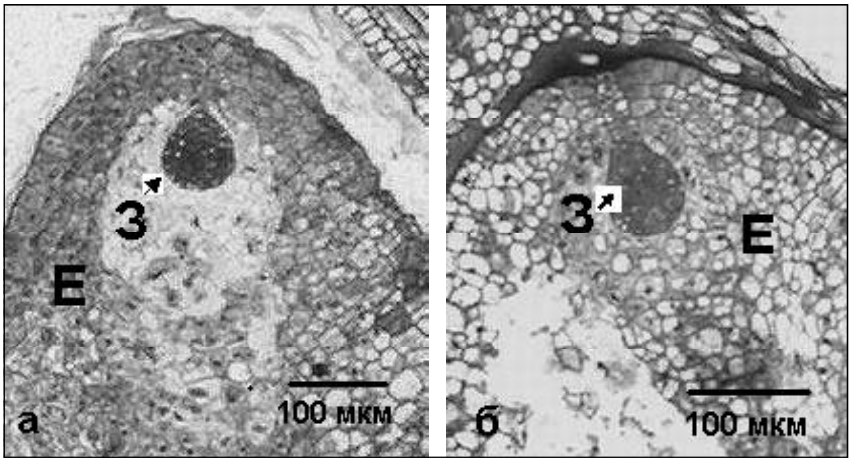

Рис. 4. Зародки *S. latifolium,* 10 діб після маркування квіток: *а* — суходільні; *б* — повітряно-водні рослини; З — зародок

Fig. 4. Embryos of *S. latifolium,* 10 days-old after flower marking: *а* — terrestrial plants; *б* — aerial-aquatic plants; З — embryo

далися з одного ряду клітин, що ділилися у поперечному напрямку відносно довжини підвіска. Проте зрідка формувалися підвіски лінійної форми, які, вірогідно, утворилися внаслідок порушення напрямку поділу клітин. Зона зі зруйнованих клітин ендосперму навколо зародків поступово розширювалася.

На 10—15-ту добу від моменту маркування квіток зародки набували овальногрушоподібної форми, проте сім'ядолі ще не розвивалися (рис. 5). Ендосперм у зародкових мішках на цей період досягав значного розвитку, і хоча він заповнював весь об'єм зародкових мішків, проте відзначалася істотна неоднорідність за розміром клітин у різних його зонах. Так, у центральній частині клітини були більшого розміру порівняно з периферійними. За довжиною сформованих насіннєвих зачатків, які містили зародки та ендосперм, рослини обох екотипів розрізнялися несуттєво: у суходільних насіннєвий зачаток цього віку досягав у середньому 1,2—1,3 мм, у повітряно-водних — 1,4—1,5 мм. Вентральний край ендосперму суходільних і повітряно-водних рослин мав рівніший край у зоні комісури, тоді як із протилежного боку його поверхня була більш хвилястою, подібно до того, що спостерігали у 5-добових насіннєвих зачатках (рис. 3, *а*).

Для зародків 15-добового віку були характерні ниткоподібні підвіски. Вони, як правило, складалися з одного ряду клітин, що ділилися у поперечному напрямку відносно довжини підвіска. Проте зрідка формувалися підвіски не зовсім типової форми, вірогідно, через порушення напрямку поділу клітин підвіска, внаслідок чого останній складався із двох шарів клітин.

Деяке зменшення зародкових мішків 15-добового віку у суходільних рослин певною мірою узгоджується з даними ряду авторів про зниження кількості ендоспермальної тканини в умовах недостатнього водопостачан-

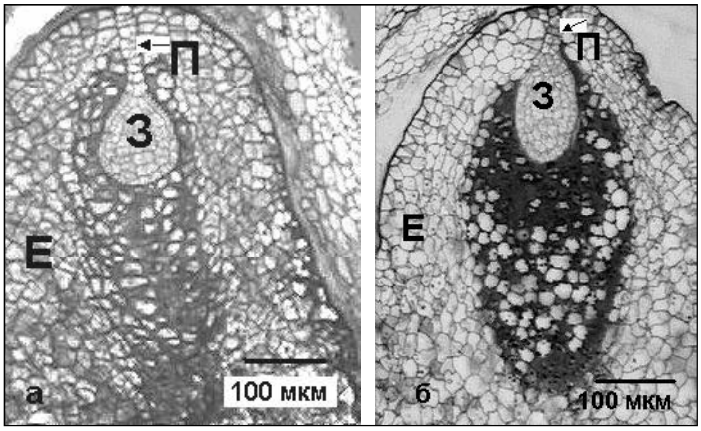

Рис. 5. Зародки *S. latifolium,* 15 діб після маркування квіток: *а* — суходільні; *б* — повітряно-водні рослини; З — зародок; П — підвісок; Е — ендосперм

Fig. 5. Embryos of *S. latifolium,* 15 days-old after flower marking: *а* — terrestrial plants; *б* — aerial-aquatic plants; З — embryo; П — syspensor; Е — endosperm

ня. Так, виявлено, що кількість клітин ендосперму в зародкових мішках кукурудзи, які через 5 діб після запилення були переведені у культуру *in vitro* з використанням середовищ з різними рівнями водного потенціалу (1,1—2,07 мікропуаз), знижувалася у 1,5 рази на 10-ту добу культивування зародків і, відповідно, майже удвічі порівняно із контролем — на 12-ту добу [10]. Засновуючись на відомостях щодо розвитку клітин ендосперму кукурудзи за умов нестачі вологи, автори вважають, що розвиток насінини у період швидкого поділу клітин ендосперму найчутливіше реагує на водний дефіцит.

Аналіз акумуляції запасних поживних речовин у клітинах зародків та ендосперму за допомогою гістохімічних реакцій показав, що у клітинах 15-добових зародків та підвісків включення запасних речовин у рослин обох екотипів ще не акумулювалися (рис. 5). Після використання специфічних для білків барвників лише ядра клітин зародків та підвісків набували блакитно-синього кольору. Зерна крохмалю та різного розміру алейронові зерна передусім спостерігалися у клітинах ендосперму, локалізованих в апікальній частині зародкових мішків. Про наявність розчинних полісахаридів у клітинах ендосперму, особливо в зоні навколо зародків, свідчать результати гістохімічної ШИК-реакції. У рослин обох екотипів виявлялося інтенсивне малиново-рожеве забарвлення, котре підтверджує наявність розчинних полісахаридів як у безклітинній зоні навколо зародків, що сформувалася внаслідок руйнації клітин ендосперму, так і в клітинах ендосперму навколо цієї зони. Досить інтенсивна реакція на полісахариди може бути результатом гідролізу зерен крохмалю, а також синтезу полісахаридів. Вважають, що на ранніх стадіях розвитку зародків домінують і використовуються для трофіки зародків, що розвиваються, глюкоза, фруктоза і сахароза [14]. Про це свідчить і збільшення зони навколо зародків.

Таким чином, на основі цитоембріологічного аналізу насіннєвих зачатків не виявлено суттєвих відмінностей за стадіями диференціації зародків повітряно-водних та суходільних рослин *S. latifolium* на ранніх етапах ембріогенезу, коли ще не сформувалися сім'ядолі, хоча мерикарпії повітряно-водних рослин у цей період були більшими, ніж у суходільних (рис. 3, *в*). У 15-добових мерикарпіях повітряно-водних рослин виявлені добре помітні поздовжні ребристі утворення, які значно збільшують розмір мерикарпіїв і виникають у процесі формування провідних пучків. У суходільних рослин поверхня мерикарпіїв була більш гладенькою, бо ребристі утворення незначні, округло-приплюснуті. Досить часто один із мерикарпіїв плоду виявлявся стерильним, внаслідок чого утворювалися плоди асиметричної форми.

Отже, незначні коливання у розмірах зародків як повітряно-водних, так і суходільних рослин *Sium* свідчать про відсутність істотної різниці за ступенем диференціації й темпами розвитку зародків на ранніх стадіях ембріогенезу. Отримані дані підтверджують припущення [9], що під впливом стресів амплітуда змін різних метаболічних процесів у насінні та плодах є значно вужчою, ніж у вегетативних органах. Так, за умов водного стресу, спричиненого звичайним дефіцитом вологи або засоленням, сумарна потужність тканин квітконоса, який забезпечує транспорт води та асимілятів, дещо зменшувалася [1]. Проте рівень водного потенціалу у репродуктивних тканинах за водного дефіциту знижувався значно менше, ніж у листках, бо тканини перикарпію лише частково втрачали тургор [16]. При цьому осмотичний потенціал насіння за водного дефіциту та за умов нормального водопостачання був подібним, як показано на насінні сої [15].

Значна подібність розвитку зародків обох екотипів *Sium* на ранніх етапах ембріогенезу може зумовлюватися як більшою стійкістю до водного дефіциту генеративних органів порівняно з вегетативними, так і кращим водозабезпеченням суходільних рослин наприкінці весни та початку літа.

Висновки

У результаті порівняльних цитоембріологічних досліджень виявлені відмінності в розмірах стилоподіїв та мерикарпіїв у повітряно-водних та суходільних рослин *Sium latyfolium* L.

Незначні коливання розмірів зародків у рослин *Sium* обох екотипів свідчать про відсутність істотної різниці за ступенем диференціації і темпами розвитку зародків на ранніх стадіях ембріогенезу, що може бути результатом достатнього водопостачання суходільних рослин навесні.

Автори статті висловлюють щиру подяку ст. наук. співр., канд. біол. наук Д.О. Климчуку (відділ клітинної біології й анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України) за надання відомостей про вміст води у ґрунті, на якому росли повітряно-водні та суходільні рослини у період бутонізації та плодоутворення.

1. *Гончарова Э.А., Добренкова Л.Г.* Взаимосвязь функциональных и структурно-анатомических перестроек при адаптации растений разных сортов земляники к экологическим стрессам // Цитология. — 1991. — **33**, № 5. — С. 96.
2. *Основы* гистологии и гистологической техники. — М.: Медицина, 1967. — 266 с.
3. *Спицын И.П., Андросова Е.П.* Влияние водного дефицита на возникновение аномалий репродуктивных органов у вишен // Биология и экология растений. — Тамбов: Изд-во Тамб. гос. ун-та, 1996. — С. 52—53.
4. *Удовенко Г.В.* Продуктивность, фотосинтетическая деятельность и утилизация ассимилятов у зерновых культур при засолении почвы // Сб. науч. тр. по прикл. ботан., генет. и селекц. ВНИИ растениеводства. — 1993. — С. 132—137.
5. *Ясеневич Н.В.* Особенности реакции сортов сои на водный стресс // Науч.-тех. бюл. ВНИИ растениеводства. — 1992. — № 223. — С. 39—43.
6. *Blackman S.A., Obendorf R.L., Leopold A.C.* Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role stress proteins // Acta Physiol. Plant. — 1994. — **16**, N 3. — P. 241—249.
7. *Chaumont F., Loomis W.F., Chrispeels M.J.* Expression of an *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin in *Dictyostelium* results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities // Proc. Nat. Acad. Sci. — 1997. — **94**(12). — P. 6202—6209.
8. *Goyal K., Walton L., Tunnacliffe A.* LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress // Biochem. J. — 2005. — **388.** — P. 151—157.
9. *Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese-Igor C., Becana M.* Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat // Plant Physiol. — 1998. — **116**, N 1. — P. 173—181.
10. *Myers P.N., Setter T.L., Madison J.T., Thompson J.F.* Endosperm cell division in maize kernels cultured at three levels of water potential // Plant Physiol. — 1992. — **99**, N 3. — P. 1051—1056.
11. *Ober E.S., Setter T.L.* Water deficit induces abscisic acid accumulation in endosperm of maize viviparous mutants // Plant Physiol. — 1992. — **98**, N 1. — C. 353—356.
12. *Ruzin S.E.* Plant microtechnique and microscopy. — New York: Oxford Univer. Press, 1999. — 214 p.
13. *Schussler J.R., Westgate M.E.* Maize kernel set at low water potential. II. Sensitivity to reduced assimilates at pollination // Crop. Sci. — 1991. — **31**, N 5. — P. 1196—1203.
14. *Sinniah U.R. , Ellis R.H., John P.* Irrigation and seed quality development in rapid-cycling *Brassica*: Soluble carbohydrates and heat-stable proteins // Annals of Botany. — 1998. — **82**, N 5. — P. 647—655.
15. *Westgate M.E., Schussier J.R., Reicosky D.C., Brenner M.L.* Effect of water deficits on seed development in soybean. II. Conservation of seed growth rate // Plant Physiol. — 1989. — **91**, N 3. — P. 980—985.
16. *Westgate M. Passioura J., Munns R.* Water status and ABA content of floral tissues in drought stressed wheat // Plant Physiol. — 1994. — **105**, N 1. — P. 99.

Рекомендує до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 21.07.2005

А.Ф. Попова, Г.Ф. Иваненко

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

РАННИЕ СТАДИИ ЭМБРИОГЕНЕЗА У ВОЗДУШНО-ВОДНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ФОРМ *SIUM LATIFOLIUM* L. (*UMBELIFERAE*)

Изложены результаты изучения формирования зародышей у воздушно-водных и суходольных растений *Sium latifolium* L. на ранних стадиях эмбриогенеза (до 15-суточного возраста). Показано, что растения обоих экотипов различаются между собой размерами зонтиков, цветков и мерикарпиев, а также морфологическими особенностями. Зародыш формируется по *Solanaceae*-типу. Эндосперм нуклеарного типа. Не выявлено существен-

ных различий в темпах развития, стадиях формирования и размерах зародышей на ранних стадиях эмбриогенеза у воздушно-водных и суходольных растений *S. latifolium,* произрастающих в условиях различного водного режима.

Ключевые слова: ембриогенез, Sium*, водный дефицит*

A.F. Popova, G.F. Ivanenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy Sciences of Ukraine, Kyiv

EARLY STAGES OF EMBRYOGENESIS IN AERIAL-AQUATIC AND TERRESTRIAL PLANTS OF *SIUM LATIFOLIUM* L. (*UMBELIFERAE*)

Results of a study of embryo formation at the early stage of embryogenesis (up to the age of 15 days) in aerial-aquatic and terrestrial plants of *Sium latifolium* L. are presented. It is shown that the plants of both ecotypes differ among themselves in the umbel, flower and mericarpium sizes, and also in morphological peculiarities. The embryo formation of *Sium* species occurred according to the *Solanaceae*-type. Endosperm developed according to the nuclear type. The essential differences in the stages of embryo formation and their sizes in the aerial-aquatic and terrestrial plants of *S. latifolium* growing during various water regimes were not estimated.

Key words: embryogenesis, Sium*, water deficit*