

Е.А. КРАВЕЦ, О.А. ХВЕДЫНИЧ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
03143 Киев, ул. Акад. Заболотного, 148
E-mail: elkrav@online.ua

ПОЛИСПЕРМИЯ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ АНТИПОД У ВИДОВ *LILIUM* (TOURN.) L.



Обнаружено, что в зародышевый мешок лилии могут входить по несколько пыльцевых трубок, которые проникают в него со стороны антиподального аппарата. Один из пары спермиев дополнительной пыльцевой трубки коопулирует с верхней антиподой, второй — с нижней антиподой или центральной клеткой. Процесс оплодотворения антиподы завершился фазой морфологического подобия ядер, характерной для постмитотического типа оплодотворения. Направленный рост пыльцевых трубок у лилии связан со специфической дифференциацией клеток антиподального аппарата, имитирующих яйцеклетку.

© Е.А. КРАВЕЦ, О.А. ХВЕДЫНИЧ, 2008

Введение. Известно, что лилия была одним из тех классических объектов, на которых С.Г. Навашин в 1898 г. открыл двойное оплодотворение у покрытосеменных растений [1]. Благодаря этому открытию стало ясно, что оплодотворенная центральная клетка, образующая эндосперм, так же как зигота, дающая начало зародышу, является продуктом полового слияния и сочетает в себе, таким образом, генетические признаки обоих родителей. Последующими исследованиями это открытие было подтверждено и распространено на многие виды растений [2–5]. Изучая оплодотворение у разных представителей покрытосеменных, Сергей Гаврилович показал, что универсальность процесса двойного оплодотворения не исключает вариаций в его прохождении. Так, у орхидных он заметил, что спермий лишь контактирует с полярными ядрами центральной клетки, так и не сливаясь с ними [3], а у *Juglans nigra* и *J. regia* наблюдал полиспермию в зародышевом мешке [5]. «...Двойное оплодотворение представляет собой нормальное явление для покрытосеменных; ...если и окажутся исключения из общего правила, они найдут себе объяснение....», — заключил ученый [3, с. 229].

Вопрос полиспермии покрытосеменных в зародышевом мешке многие годы оставался «в тени», так и не получив должного внимания. Вместе с тем эта проблема имела непосредственное отношение к двойному оплодотворению: во-первых, в связи с вероятностью замещения яйцеклетки и центральной клетки в ходе оплодотворения, во-вторых, в связи с параллельными процессами, которые могут дополнять, изменять или просто сопровождать процесс двойного оплодотворения.

Возможность оплодотворения других, помимо яйцеклетки и центральной клетки, элементов зародышевого мешка обсуждалась еще до открытия С.Г. Навашина. Так, Овертон [6] в 1891 г. описывал развитие у *Lilium martagon* синергидного зародыша в результате оплодотворения синергиды спермием дополнительной пыльцевой трубки, а Манн (Mann, 1893; цит. по [7]) у *Miosurus minimus* и Шаттук (Shattuck, 1905; цит. по [7]) у *Ulmus americana* наблюдали оплодотворение антиподы спермием пыльцевой трубки, проникшей в зародышевый мешок со стороны халазы. Позднее Экдаль (Ekdahl, 1941; цит. по [8]) у *Nigella*

arvensis также наблюдал оплодотворение верхней антиподы. Два последних случая исследователи связывали со спецификой дифференциации синергид и антипод — их сходством с яйцеклеткой. Следовательно, оплодотворение синергид и антипод — реальное, хотя и редкое явление, которое может быть связано со специфической дифференциацией элементов зародышевого мешка.

Известно, что в зародышевый мешок покрытосеменных может войти одна, две, три и больше пыльцевых трубок, внося в него по несколько пар спермиев [5, 7–14, 17, 18]. В большинстве случаев спермии дополнительных пыльцевых трубок в оплодотворении не участвуют, а вместе с цитоплазмой ПТ утилизируются зародышевым мешком [5, 9–12, 15, 16]. Изредка дополнительные спермии проникают в яйцеклетку и центральную клетку [5, 9–14]. Что касается особенностей структурно-функциональной организации женского гаметофита покрытосеменных, то в зародышевых мешках ряда тетраспорических типов была показана относительная равнозначность клеток яйцевого аппарата и антипод в отношении оплодотворения [17–25]. В этой связи наиболее вероятным является оплодотворение синергид [17, 26]. А вот феномен оплодотворения антипод и по сей день считается дискуссионным, и в современных цитоэмбриологических работах не рассматривается [27].

Материал и методы. Объекты исследования — лилия Генри (*Lilium henry* Vak., $2n = 24$) и лилия королевская (*L. regale* L., $2n = 24$), принадлежащие к подроду *Eulirion* Reichb., самосовместимые виды, родоначальники известной группы Орлеанских гибридов, а также самосовместимый гибридный сорт Bright Star ($2n = 24$) из группы звездообразных Орлеанских гибридов [28] *. С учетом временных параметров процессов опыления и оплодотворения завязи фиксировали каждые сутки в течение двух недель после искусственного опыления. Постоянные цитологические препараты для светооптического исследования

* Авторы выражают признательность руководству Центрального ботанического сада АН УССР за предоставленную в то время возможность работы с коллекционным материалом питомника декоративных луковичных растений.

изготавливали согласно общепринятой цитологической методике [29] и ее авторским модификациям применительно к данному объекту. Завязи фиксировали по Карнуа и Навашину. Срезы толщиной 25–30 мкм окрашивали разными гистологическими красителями, преимущественно реактивом Шиффа по Фельгену и пикриноиндигокармином по Аксену. Для анализа использовали также и временные препараты, изготовленные из поперечных срезов завязи и окрашенные ацетокармином или ацетоорсеином.

Результаты исследования и их обсуждение. На вторые-третьи сутки после опыления в полости столбика и завязи пестика исследуемых видов наблюдался массовый рост пыльцевых трубок. На третьи-четвертые сутки пыльцевые трубки (ПТ) входили в семяпочки центральной части завязи. Обычно в одну семяпочку проникало по несколько пыльцевых трубок (рис. 1, а, б). При искусственном опылении массовый характер роста дополнительных ПТ определяется обилием пыльцы, нанесенной на рыльце пестика.

Основная, или первая, пыльцевая трубка прорастает в семяпочку и зародышевый мешок (ЗМ) через микропиле. Дополнительные ПТ проникают в ЗМ, следом за основной, через микропиле или любым другим путем: через интегументы, по тканям нуцеллуса вдоль продольной оси семяпочки или поперек ее в направлении микропиле или халазы ЗМ (рис. 1, а–в). Дополнительная ПТ может входить в зародышевый мешок через вторую синергиду, между клетками яйцевого аппарата или, обходя их, проникать непосредственно в «щель» между яйцеклеткой и центральной клеткой ЗМ, где она и вскрывается. В других случаях одна или две дополнительные ПТ, пройдя микропиле ЗМ, растут далее, обходя яйцевой аппарат, вдоль центральной клетки в направлении антипод. Однако большая часть ПТ, входящих в семяпочку, растут, не проникая в микропиле, через клетки нуцеллуса по направлению к халазальной части зародышевого мешка, оставляя за собой «след» из разрушенных клеток. Большинство дополнительных ПТ так и не попадают в ЗМ, постепенно резорбируясь тканями семяпочки, или же вскрываются в халазальной части семяпочки под антиподальным аппара-

том. Довольно часто спермии дополнительных ПТ, особенно тех из них, которые продвигаются к халазе, отличаются крупными размерами и разрыхленной структурой хроматина (рис. 1, в).

Особое внимание уделим пыльцевым трубкам, достигающим до антиподального аппарата ЗМ. Своеобразие упомянутого типа роста ПТ заключается в его неслучайном характере и хемотропной ориентации в отношении яйцеподобной антиподы (рис. 2). Дополнительные ПТ достигают до антиподального аппарата, проникают между верхней антиподой и центральной клеткой или между верхней и нижними антиподами. ПТ образует вздутие и вскрывается, освобождая пару спермиев, один из которых вступает в контакт с верхней антиподой (рис. 3, а), проникает через ее оболочку и вступает в контакт с ее ядром (рис. 3, б–г).

Спермий в ходе оплодотворения антиподы претерпевает преобразования, свойственные

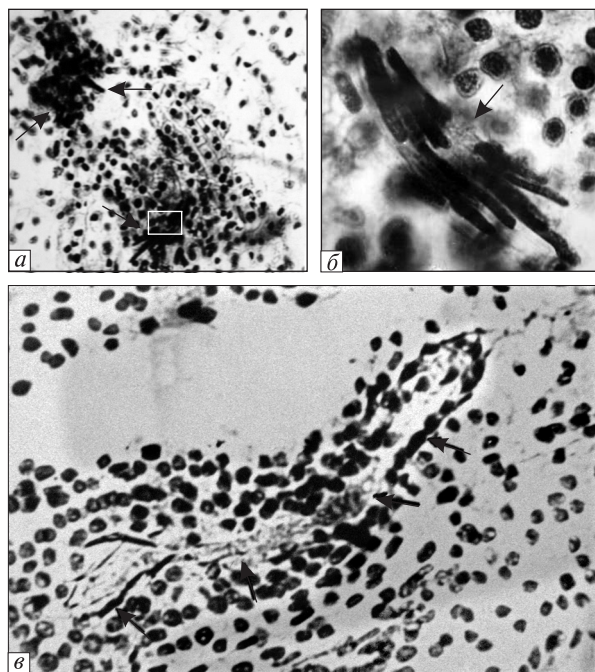


Рис. 1. Скопление пыльцевых трубок в микропиллярной и халазальной частях семязпочки: а – общий вид; б – фрагмент халазальной части семязпочки с пыльцевыми трубками; в – пыльцевая трубка, растущая через микропиле к халазальной части зародышевого мешка; лилия Генри, 4 сут после опыления, сорт Bright Star, 5 сут после опыления. Окраска по Фельгену

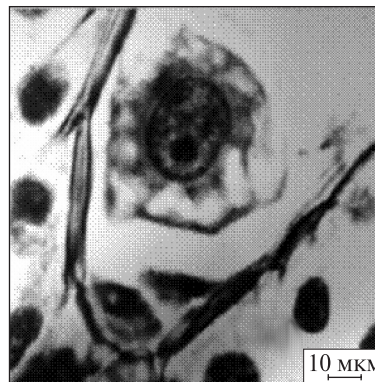


Рис. 2. Имитация яйцеклетки верхней антиподой; лилия Генри, 6 сут после опыления. Окраска пикрино-индигокармином

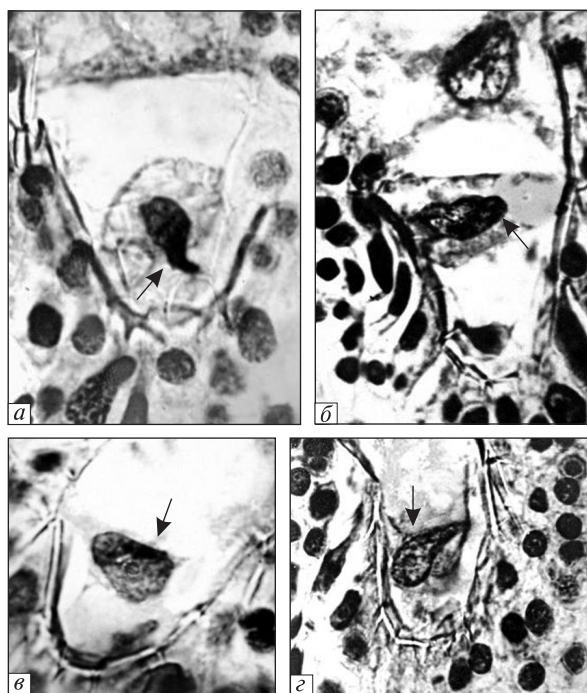


Рис. 3. Оплодотворение верхней антиподы: а – спермий в контакте с верхней антиподой; б, в – последовательные фазы преобразования спермия в контакте с ядром антиподы; г – деспирализация хроматина спермия и формирование ядрышка; лилия Генри и лилия королевская, 5 сут после опыления, сорт Bright Star, 6 сут после опыления. Окраска пикрино-индигокармином

сингамии [1] и характерные для постмитотического типа оплодотворения [20]: хроматин его разрыхляется и деспирализуется, формируется ядрышко (рис. 3, б–г; 4, а, б). Один конец спермия может оставаться узким, другой

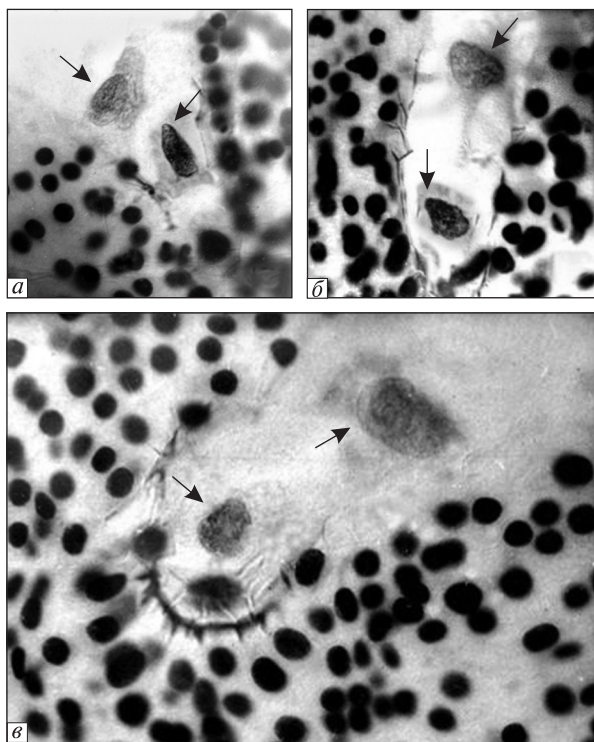


Рис. 4. Оплодотворение верхней антиподы и центральной клетки. Контакт одного спермия с ядром верхней антиподы, другого — с нижним полярным ядром: *а, б* — фаза разрыхления спермия; *в* — фаза морфологического подобия ядер; лилия королевская, 5–6 сут после опыления. Окраска по Фельгену

округляется и разрыхляется быстрее. Структурированность ядра антиподы в контакте со спермием становится более тонкой, интенсивность реакции Фельгена снижается, возрастает объем и вакуолизация ядрышек. Контуры антиподальной клетки приобретают округлые очертания, оболочка утолщается, изменяется характер вакуолизации цитоплазмы. Таким образом верхняя антипода имитирует зиготу. В область антиподального аппарата могут войти две пыльцевые трубки. В этом случае вторая пара спермиев вступает в контакт с нижними антиподами.

Поведение второго спермия более изменчиво. Он может не быть задействован в процессе оплодотворения и оставаться вблизи верхней антиподы или же контактировать с нижними антиподами. Нередко он проникает в центральную клетку с ее халазального конца и вступает в контакт с нижним полярным ядром (рис. 4,

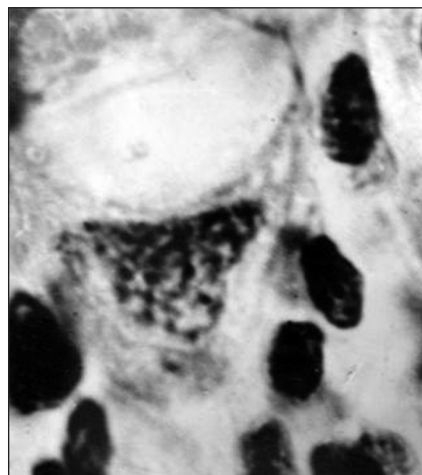


Рис. 5. Профаза первого деления верхней антиподы; сорт Bright Star, 7 сут после опыления. Окраска пикро-индигокармином

а–в). По-видимому, оплодотворение центральной клетки вторым спермием зависит от ряда причин, о которых следует поговорить отдельно. Отметим здесь, что полиспермия центральной клетки может задерживать тройное слияние — сингамия в этом случае часто опережает тройное слияние. Судьба оплодотворенной антиподы остается не вполне ясной. Процесс оплодотворения антиподы, который нам удалось проследить, завершился фазой морфологического подобия ядер (рис. 4, *в*), характерной для постмитотического типа оплодотворения. Исследование картин объединения ядер в ходе первого митотического деления оплодотворенной клетки осложнялось случаями апомиксиса — редуцированной апогаметии верхней антиподы (рис. 5).

Мы полагаем, что проникновение пыльцевых трубок в халазальную часть зародышевого мешка и оплодотворение антипод — явления неординарного характера, но не исключение и не патология, поскольку в большинстве своем не влияют на ход двойного оплодотворения в ЗМ. Причины указанного феномена, по-видимому, связаны с особенностями структурной организации зародышевого мешка *Fritillaria*-типа [17–19, 21–25]. Действительно, в структурно-функциональном отношении клетки яйцевого и антиподального аппаратов ЗМ данного типа характеризуются определенным сходством, своего рода зеркальностью (симметрией).

По-видимому, механизм направленного роста пыльцевых трубок — хемотропизма — связан у лилии со специфической дифференциацией клеток антиподального аппарата, имитирующих яйцеклетку. При этом содержимое дополнительных пыльцевых трубок, проникших в семяпочку и зародышевый мешок, утилизируется, выполняя тем самым важную трофическую функцию, которую, вероятно, «недорабатывает» антиподальный аппарат. Это подчеркивает физиологическое значение халазы семяпочки и ЗМ как единого гаустория, снабжающего женский гаметофит пластическими веществами. Помимо этого, содержимое дополнительных ПТ в любом случае несет потенциальную способность к реализации своей генетической функции. Показано, что фрагменты ДНК спермиев дополнительных пыльцевых трубок могут включаться в геном зародыша и эндосперма [30, 31].

E.A. Kravets, O.A. Khvedynich
POLYSPERMISM AND ANTIPODAL
FERTILIZATION
IN *LILIUM* (TOURN.) L. SPECIES

It has been shown that several pollen tubes can penetrate into the embryo sac on the source side of the antipodal apparatus. One of the pair of sperms of additional pollen tube copulates with the upper antipodal, the second sperm copulates with the lower antipodal or rarely penetrates in the central cell. The process of fertilization was accomplished by the phase of nuclei morphological similarity characteristic of syngamy (by postmitotic type of fertilization according to Gerasimova-Navashina). A directional growth of additional pollen tubes involves a specifically differentiation of antipodal cells that imitates the egg cell.

O.A. Kravets, O.O. Khvedynich
ПОЛІСПЕРМІЯ ТА ЗАПЛІДНЕННЯ
АНТИПОД У ВИДІВ
LILIUM (TOURN.) L.

Виявлено, що в зародковий мішок лілії може входити по декілька пилкових трубок, що проникають в нього з боку антиподального апарата. Один з пари спермій додаткової пилкової трубки коопулює з верхньою антиподою, інший — з нижньою антиподою або центральною клітиною. Процес запліднення антиподи завершувався фазою морфологічної ідентичності ядер, яка притаманна постмітотичному типу запліднення. Спрямований ріст пилкових трубок у лілії пов'язаний зі специфічною диференціацією клітин антиподального апарата, що імітують яйцеклітину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Навашин С.Г. Результаты пересмотра процессов оплодотворения у *Lilium martagon* и *Fritillaria tenella* // Избранные труды. Т.1. — М.; Л., 1951. — С. 188—192.
2. Guignard L. Sur les antherosoides et la double copulation sexuelle chez les vegetaux angiosperms // Rev. gen. — 1899. — 11. — P. 131—138.
3. Навашин С.Г. Об оплодотворении у сложноцветных и орхидных // Избранные труды. Т.1. — М.; Л., 1951. — С. 225—229.
4. Навашин С.Г. О процессах оплодотворения у некоторых двудольных // Там же. — С. 230—335.
5. Навашин С.Г., Финн В.В. К истории развития халацогамных *Juglans nigra* и *J. regia* // Там же. — С. 271—325.
6. Overton E. Beitrag zur Kenntnis der Entwicklung und Vereinerung der Geschlechtsproducte bei *Lilium Martagon* // Deih. Bot. Zentralblatt. — 1891. — 50. — P. 336—337.
7. Schnarf K. Embryologie der Angiospermen. — Berlin, 1927/1929. — 690 p.
8. Магешвари П. Эмбриология покрытосеменных. — М., 1954. — 439 с.
9. Gerasimova E.N. Fertilization in *Crepis capillaris* // Cell. — 1933. — 42. — P. 103—114.
10. Герасимова-Навашина Е.Н. Пыльцевое зерно, гаметы и половой процесс у покрытосеменных // Тр. Бот. ин-та. — 1951. — Сер. 7, вып.2. — С. 194—355.
11. Бенецкая Г.К. Оплодотворение и эмбриогенез у подсолнечника при различных способах опыления // Изв. АН АрмССР. Сер. биол. — 1952. — 5. — С. 144—149.
12. Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. — М.: Наука, 1976. — 496 с.
13. Банникова В.П. Цитоэмбриология межвидовой несовместимости у растений. — Киев : Наук. думка, 1975. — 284 с.
14. Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. — Л.: Колос, 1974. — 206 с.
15. Поляков И.М. Применение радиоактивных изотопов в исследовании процесса оплодотворения у растений // Сессия АН СССР по мирному использованию атомной энергии. — М., 1955. — С. 221—234.
16. Поляков И.М., Михайлова П.В. Рост пыльцевых трубок в разных частях пестика и их избирательность // Изв. АН СССР. Сер биол. — 1951. — № 1. — С. 31—35.
17. Кравец Е.А. Развитие зародышевого мешка и процесс оплодотворения у представителей рода *Lilium* (Tourn.) L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1987. — 16 с.
18. Кравец Е.А. Развитие зародышевого мешка и про-

- цесс оплодотворения у представителей рода *Lilium* (Tournef.) L.: Дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1986. — 200 с.
19. *Khvedynich O.A., Kravets E.A.* Fertilization in lily as a realization of peculiarity of embryo sac structure (Fritillaria-type) // Embryology and seed reproduction : Abstr. XI Intern. symp. — Leningrad, 1990. — P. 75.
 20. *Герасимова-Навашина Е.Н.* Оплодотворение как онтогенетический процесс // Бот. журн. СССР. — 1957. — **42**, № 11. — С. 1654–1673.
 21. *Герасимова-Навашина Е.Н.* Цитологические данные о стимуле к развитию клеток зародышевого мешка // Тр. БИН АН СССР. — 1962. — **7**, № 5. — С. 238–249.
 22. *Петрова Т.Ф.* Цитоэмбриология лилейных. Подсемейство *Lilioideae*. — М.: Наука, 1977. — 213 с.
 23. *Мовсесян С.Н.* Отклонения в развитии женского гаметофита у рудбекии // Эмбриология покрытосеменных растений. — Кишинев : Штиинца, 1973. — С. 140–147.
 24. *Солнцева М.Г.* Типы развития зародышевого мешка и морфология зародыша у *Rudbeckia laciniata* L. // Эмбриология покрытосеменных растений. — Кишинев : Штиинца, 1973. — С. 47–56.
 25. *Плюц Т.А.* Ультраструктура зародышевого мешка покрытосеменных. — К. : Наук. думка, 1992. — 145 с.
 26. *Хведынич О.А., Кравец Е.А.* Оплодотворение синергид у лилии // Бот. журн. СССР. — 1991. — **76**, № 2. — С. 236–240.
 27. *Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции* / Под ред. Т.Б. Батыгиной. — Т. 1, 2. — С.-Петербург, 1997.
 28. *Шиповская Е.И., Колокольникова В.И., Матросова Г.В.* Лилии (виды, разновидности и гибридные формы). — М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1972. — 228 с.
 29. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1974. — С. 288.
 30. *Pandey K.K.* Gametic gene transfer in *Nicotiana* by means of irradiated pollen // Genetics. — 1979. — **49**, № 1. — P. 53–69.
 31. *Pandey K.K.* Gene transfer through the use of sublethally irradiated pollen: the theory of chromosome repair and possible implication of DNA repair enzymes // Heredity. — 1986. — P. 37–46.

Поступила 05.12.07