

УДК 582.594.2: 581.143.6

## ИЗУЧЕНИЕ ЭТАПОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ *CERPHALANTHERA DAMASONIUM* (MILL.) DRUCE. (ORCHIDACEAE) В СВЯЗИ С ВВЕДЕНИЕМ В СИСТЕМУ *IN VITRO*

Теплицкая Л.М.<sup>1</sup>, Назаров В.В.<sup>2</sup>, Астапенко Н.А.<sup>1</sup>, Соломыкина А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина.

<sup>2</sup> Негосударственное образовательное учреждение им. М.В. Ломоносова, Нижний Новгород, Россия

E-mail: nataly-ast@inbox.ru

Получены данные о развитии пыльника и этапах микроспорогенеза на примере *C. damasonium*. Показана связь между стадиями развития пыльника, его размером и величиной бутона. Определена критическая стадия для введения пыльника *C. damasonium* в культуру *in vitro*.

**Ключевые слова** : *Orchidaceae*, *Cephalanthera damasonium*, пыльники, культура *in vitro*.

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день, в связи с сохранением биологического разнообразия представителей семейства *Orchidaceae*, перспективным направлением является культивирование *in vitro* генеративных структур этих растений. Культура пыльников *in vitro* представляет интерес как резервный способ размножения, поскольку пыльники имеют высокий морфогенетический потенциал и в результате переключения программы развития с гаметофитного пути на спорофитный возникает возможность получения растения-регенеранта [1, 2].

Для эффективного культивирования пыльников необходимо детальное изучение эмбриологии, которое позволит выявить критическую стадию развития пыльника для введения в систему *in vitro*. Этапы формирования пыльников орхидных изучены мало, для крымских видов такие работы единичны [3]. Актуальность данной проблемы связана также с тем, что изучение мужской генеративной сферы на всех этапах ее формирования позволяет выявить особенности эмбриологии пыльников, которые могут оказывать влияние на формирование полноценных семян и в конечном итоге репродукцию вида.

Целью работы было изучение этапов формирования пыльника и пыльцевых зерен *C. damasonium* для определения возможных аномалий развития и выявления критического периода введения пыльника в культуру *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для проведения исследований служил пыльцеголовник крупноцветковый – *C. damasonium*. Пыльники отбирали из нераскрывшихся бутонов различного размера (от 0,1 см до 2 см).

Культивировали пыльники в колбах на агаризированных питательных средах, дополненных 6-БАП, ИМК, и 2,4-Д в качестве основных дедифференцирующих факторов [4, 5]. Условия культивирования: температура 23-25 °С, освещенность 2-3 тыс. люкс при 10 часовом фотопериоде, относительная влажность воздуха составляла 70 %. Цитологические и гистохимические исследования проводили на временных препаратах, окрашенных ацетокармином, суданом III и р-ром Люголя [6, 7]. Микроскопические исследования проводили с помощью бинокля МБС-1А. Микрофотографии препаратов были сделаны фотоаппаратом Olympus C-360Z.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроскопические и морфометрические исследования проводили на различных стадиях развития пыльника *C. damasonium*. Исследования показали, что в бутонах размером от 0,1 см до 0,2 см пыльник находится на начальном этапе премеитического периода развития и представляет собой однородные меристематические клетки, окруженные эпидермисом (табл. 1, рис. 1).

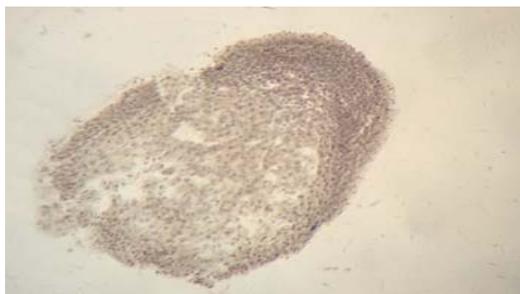


Рис. 1. Пыльник *C. damasonium* на начальном этапе развития (меристематические клетки).

В бутонах размером от 0,3 см до 0,5 см пыльник еще находится в премеитическом периоде развития, наблюдается формирование пыльцевых гнезд. Стенка пыльника представлена мелкими интенсивно окрашенными клетками. Более крупные просветленные клетки слабо окрашены, являются клетками спорогенной ткани, которая в будущем даст материнские клетки микроспор (микроспороциты). Уже на ранних этапах развития в пыльниках *C. damasonium* обнаруживаются элементы проводящих пучков, хаотично рассеянных по толщине стенки пыльника (рис. 2).

В бутонах размером от 0,6 см до 0,8 см пыльник находится на завершающем этапе премеитического периода развития. Стенка пыльника состоит из эпидермиса, эндотеция – наружного слоя стенки, среднего слоя и тапетума. Тапетум *C. damasonium* относится к секреторному типу, однорядный. В начале

**ИЗУЧЕНИЕ ЭТАПОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ CERHALANTHERA**

премейотической интерфазы клетки тапетума одноядерные, содержат мало цитоплазмы, прямоугольной формы, несколько вытянуты в длину и слабо окрашены. Клетки эндотеция мало отличаются от клеток эпидермиса и клеток среднего слоя на данном этапе развития стенки пыльника. Средний слой представлен 1-3 рядами округлых слабо вакуолизированных клеток. Спорогенная ткань располагается в центральной части пыльника, количество клеток ее увеличивается за счет митотических делений, образуя микроспороциты (рис. 3).

**Таблица 1.**

**Стадии развития пыльника в бутонах различного размера**

№	Размер бутона, см	Размер пыльника, мкм		Стенка пыльника	Спорогенная ткань
		длина	ширина		
<b>Премейотический период развития пыльника</b>					
1	0,1-0,2	—	—	Меристематические клетки → археспориальная клетка → первичный париетальный слой	Меристематические клетки → археспориальная клетка → первичный париетальный слой
2	0,3-0,5	—	—	Начало дифференциации первичного париетального слоя → начало формирования стенки пыльника	Начало дифференциации первичного париетального слоя → начало формирования клеток спорогенной ткани
3	0,6-0,8	27± 0,024	7,725 ± 0,02	Первичный париетальный слой → эндотеций, вторичный париетальный слой → средний слой и тапетум	Клетки спорогенной ткани → митоз → микроспороциты
<b>Мейотический период развития пыльника</b>					
4	0,9-1,0	31,8± 0,024	12,7± 0,02	Эндотеций → фиброзные утолщения, средний слой сжимается, начало деградации тапетума	Микроспороциты → мейоз 1 → диады микроспор → мейоз 2 → тетрады микроспор → одноядерные микроспоры
<b>Постмейотический период развития пыльника</b>					
5	1,1-1,5	39,2± 0,024	13,6± 0,02	Стенка деградирует, нет тапетума, нет среднего слоя, фиброзный слой очень тонкий.	2хклеточные пыльцевые зерна → поллинии
6	1,6-2	40,4± 0,024	13,9 ± 0,02	Фиброзный слой	2хклеточные пыльцевые зерна в поллинии накануне раскрытия пыльника

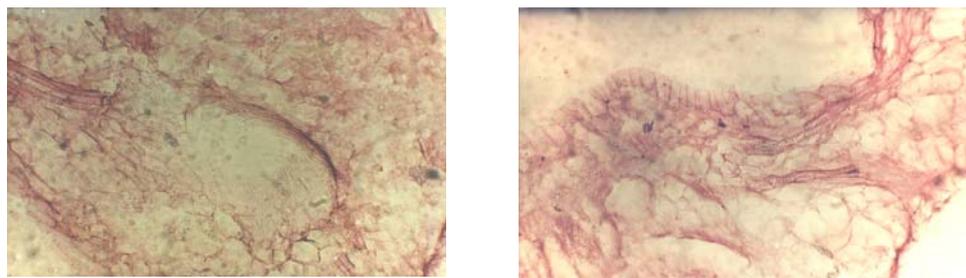


Рис. 2. Формирование тканей стенки пыльника в премейотическом периоде развития.

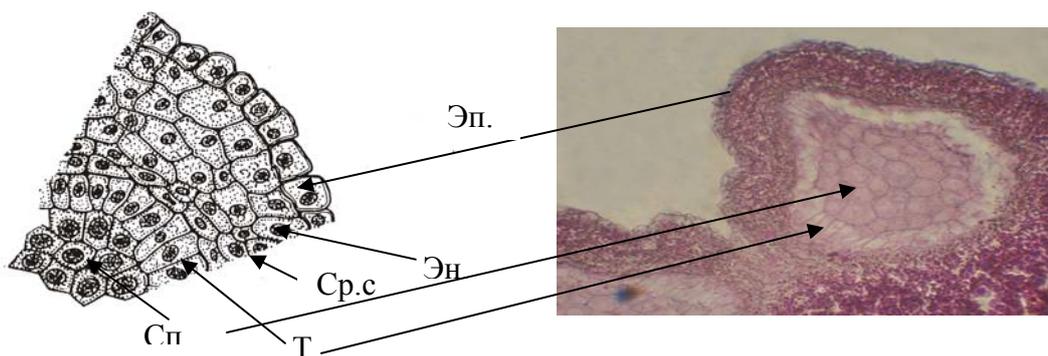


Рис. 3. Премейотическая интерфаза пыльника *C. damasonium*.

Эп – эпидермис; Эн – эндотеций; Ср. сл. – средний слой; Т – тапетум; Сп. тк. – спорогенная ткань.

В бутонах размером от 0,9 см до 1,0 см пыльник *C. damasonium* переходит в мейотический период развития. Происходит формирование тетрады микроспор, которые могут по-разному располагаться: Т-линейно или тетраэдрически (рис. 4). На данном этапе развития микроспоры имеют плотную невакуолизированную цитоплазму и ядро, расположенное в центре клетки. Данный этап завершается формированием одноядерной микроспоры.

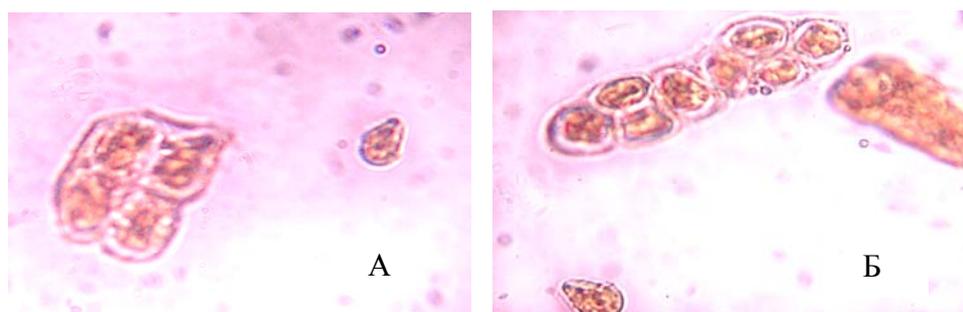


Рис. 4. Расположение микроспор в пыльнике *C. damasonium*: А – тетраэдрическое; Б – Т-линейное.

Слои стенки пыльника дифференцируются: в клетках эндотеция появляются фиброзные утолщения. Клетки и ядра среднего слоя сжимаются, начинается деградация тапетума. Таким образом, стенка пыльника сильно уплощается (рис. 5).

В бутонах размером от 1,1 см до 1,5 см пыльник переходит в постмейотический период развития. Сформированные клеточные пыльцевые зерна образуют общую восковидную массу – поллиний (рис. 6). Стенка деградирует: отсутствует тапетум и средний слой, фиброзный слой очень тонкий. В бутонах размером от 1,6 до 2 см находятся зрелые двухклеточные пыльцевые зерна, собранные в поллиний накануне раскрытия пыльника.

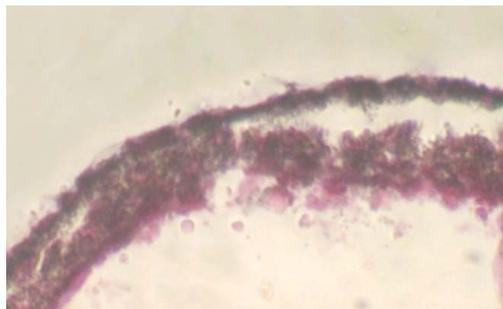


Рис. 5. Морфологические изменения стенки пыльника *C. damasonium* на позднем этапе мейотического периода.



Рис.6. Фрагмент поллиния *C. damasonium*.

Нами установлена тесная корреляция между величиной бутона и изученными стадиями развития пыльника у *C. damasonium*. Результаты предварительных исследований показали, что индукция каллусогенеза возможна при введении в культуру пыльников из бутонов определенного размера. Подобные закономерности известны и у других покрытосеменных растений [1, 5, 8]. Для ряда изученных видов покрытосеменных растений оптимальной стадией культивирования пыльников *in vitro* является стадия одноядерной микроспоры [1, 5, 8, 9]. На этой стадии проявляется автономность микроспоры, в связи с чем, именно эта стадия определяет дальнейший путь развития микроспоры по детерминированной программе гаметофитогенеза или, в условиях *in vitro*, спорофитогенеза. Нами было экспериментально показано, что стадия одноядерной микроспоры является оптимальной для введения в культуру *in vitro* пыльников *C. damasonium*.

Нами установлено, что у *C. damasonium* стадия одноядерной микроспоры соответствует размеру бутона от 0,9 до 1,0 см. Эта стадия является критической для введения пыльника *C. damasonium* в культуру *in vitro*. Данная информация в будущем позволит значительно облегчить выбор критической стадии для введения этого орхидного в культуру *in vitro*.

Отсутствие явных аномалий в развитии пыльников у *C. damasonium* на всех изученных этапах вероятно обусловлено факультативной автогамностью этого орхидного. В отличие от других представителей рода *Cephalanthera* ростеллум у

*C. damasonium* сильно редуцирован, что приводит к соприкосновению секрета рыльца с пылью на 2-3 день после раскрытия цветка. С этой точки зрения *C. damasonium* является модельным растением для введения в культуру *in vitro*.

### ВЫВОДЫ

1. Установлены основные границы этапов формирования пыльников *C. damasonium*. Аномалии в развитии пыльников на всех изученных этапах не наблюдались.
2. Показана тесная корреляция между величиной бутона и изученными стадиями развития пыльника. Это дает возможность использовать величину бутона как показатель оптимальной стадии развития пыльника для введения его в культуру *in vitro*. Так, стадии одноядерной микроспоры, которая является оптимальной стадией для введения пыльников *C. damasonium* в культуру *in vitro*, соответствует размер бутона от 0,9 до 1,0 см.

### Список литературы

1. Батыгина Т.Б. Пыльник как модель изучения морфогенетических потенциалов и путей морфогенеза / Т.Б. Батыгина // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.1: Генеративные органы цветка [ред. Батыгина Т.Б.]. – СПб.: Мир и семья, 1994. – Т.1. – С. 120–121.
2. Эмбриологические основы андроклии пшеницы / [Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Титова Г.Е., Сельдиминова О.А.] – Уфа, 2005. – 230 с.
3. Лагутова О.И. Цитозембриологическое исследование дикорастущих видов орхидей Южного берега Крыма : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / О.И. Лагутова– Ялта, 1992. – 21 с.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Бутенко Р.Г. – М. : Наука, 1964. – 272 с.
5. Круглова Н.Н. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. – 22 с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / Паушева З.П. – М.: Колос, 1988. – 170 с.
7. Дженсен У. Ботаническая гистохимия / Дженсен У. – М.: Мир, 1965. – 378 с.
8. Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника / Резникова С.А. – М. : Наука, 1984. – 266 с.
9. Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro* : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.20 «Биотехнология» / С.А. Игнатова– Ялта, 2004. – 25 с.

Теплицька Л.М. Вивчення етапів формування пильовиків *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce (*Orchidaceae*) у зв'язку з введенням в систему *in vitro* / Л.М. Теплицька, В.В. Назаров, Н.А. Астапенко [та ін.] // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – № 2. – С. 163-169.

Отримані дані про розвиток пильовика і етапи мікроспорогенезу на прикладі *C. damasonium*. Показаний зв'язок між стадіями розвитку пильовика, його розміром і величиною бутона. Визначена критична стадія для введення пильовика *C. damasonium* в культуру *in vitro*.

**Ключові слова** : *Orchidaceae*, *Cephalanthera damasonium*, пильовики, культура *in vitro*.

Teplitskaya L.M. Study of the stages of *Cephalanthera damasonium*'s (Mill.) Druce (Orchidaceae) anther's forming in connection with introduction to *in vitro* system / L.M. Teplitskaya, V.V. Nazarov, N.A. Astapenko [et al.] // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. Series : Biology. – 2010. – V.23 (62). – № 2. – P. 163-169.

The facts about anther's development and stages of microsporogenesis on the example of *C. damasonium* are fined. The connection between the stages of anther's development, his size and size of bud is shown. The critical stage for leading anther of *C. damasonium* to *in vitro* culture is determined.

**Keywords** : *Orchidaceae*, *Cephalanthera damasonium*, anther's, *in vitro* culture.

Поступила в редакцию 26.05.2010 г.