

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕМЯЗАЧАТКА ДВУХ ВИДОВ *TROLLIUS* (*RANUNCULACEAE*)

Л.В. Буглова

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: astro11@rambler.ru

Проведены гистохимические исследования зрелого семязачатка у видов *Trollius asiaticus* L. и *T. ledebourii* Reichenb. Изучено распределение углеводов и соотношение РНК/ДНК. Выявлено, что халазальная зона нуцеллуса имеет сложную организацию и образует своеобразный подиум, состоящий из морфологически различных клеток. Гистохимические различия у них минимальны.

Ключевые слова: *Trollius*, семязачаток, зародышевый мешок, подиум, нуцеллус, антиподы.

HISTOCHEMICAL STUDY OF TWO SPECIES AT *TROLLIUS* (*RANUNCULACEAE*) OVULE

L.V. Buglova

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Russia, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: astro11@rambler.ru

The histochemical analysis of the mature ovule was performed in the species of *Trollius asiaticus* L. and *T. ledebourii* Reichenb. Distribution of carbohydrates and RNA/DNA ratio were studied. It was found that halazal nucellus area had a complex organization, and formed an atypical podium consisting of morphologically different cells. Histochemical differences in them are minimal.

Key words: *globeflower*, *ovule*, *embryo sac*, *podium*, *nucellus*, *antipodal cells*.

ВВЕДЕНИЕ

Цитоэмбриологические и гистохимические исследования азиатских видов *Trollius* L. до сих пор остаются неполными. Так, для двух видов рода купальница описано развитие зародышевого мешка (ЗМ) (Соколовская, 1981; Brandari, Kapil, 1964), однако строение семязачатка остается неизученным. Купальницы представляют большой интерес в эволюционном плане, поскольку для них, как и для большинства *Ranunculaceae*, характерно сочетание эволюционно продвинутых и примитивных признаков.

Поэтому недостаток информации препятствует составлению более полной картины о систематических взаимосвязях в растительном царстве. Большинство видов рода произрастают в удаленных от цивилизации умеренных, высокогорных, труднодоступных областях Северного полушария, что тормозит их изучение.

Цель настоящей работы – провести гистохимические исследования зрелого семязачатка у двух видов рода *Trollius* L.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследований были виды *Trollius asiaticus* L. и *T. ledebourii* Reichenb.

Материал для фиксации брали от растений, выращенных на территории ЦСБС СО РАН (Новосибирск), которые, в свою очередь, были пересажены в виде корневищ из природных популяций.

Постоянные препараты готовились по стандартным методикам (Прозина, 1960) и дополнительно к этому – по экспресс-методике (Справочник..., 2004). Для ускоренного приготовления препаратов семязачаток, его базальные структуры и ЗМ (после маце-

рации в 1N HCl) вычленили препаративными иглами под бинокулярной лупой ЛОМО МСП-1. Цветы фиксировали в FAA (формалин, уксусная кислота, спирт), окрашивали пропионовым кармином или гематоксилином Гейденгайна (Прозина, 1960). Использовались гистохимические реакции на полисахариды: ШИК-реакция, окрашивание суточным сафранином, Конго красным, анилиновым синим; по Штамму, Cl-Zn-I (Дженсен, 1965). Для выявления ДНК/РНК осуществляли реакцию с метиловым зеленым пиронином (Справочник..., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У изученных видов купальниц семязачаток бигемальный. Микропиле образовано внутренним интегументом. Нуцеллус формируется по медионуцеллярному типу синдермальной многослойной вариации. Для этого типа характерен однослойный нуцеллус в микропилярной и латеральной частях и массивный многослойный в халазальной зоне (Шамров, 2008).

Зародышевый мешок овально-удлиненный, антиподы образуют антиподиальные гаустории. Непосредственно прилегая к ЗМ в халазальной части нуцеллуса, наблюдается сложная специализированная, четко дифференцированная структура, которая формируется по мере его развития. Клетки этой структуры соединяются нитчатым каркасом, который образован неравномерным утолщением клеточных стенок. Каркас и соединенные им клетки бокаловидно облегают нижнюю часть антиподиальных гаусториев и в меньшей мере антиподы. Базальные клетки этой структуры крупные, латеральные, вытянутые вдоль ЗМ. Тяжи объединяющего каркаса не разрушаются 1N HCl при мацерации даже в течение 15 мин (при более длительной мацерации начинается лизис клеточных стенок). Поэтому при препарировании вся структура выделяется как единое целое. По морфологическому положению в семязачатке и приведенным ниже гистохимическим данным мы идентифицировали ее как подиум. Находящиеся ниже под подиумом нуцеллярно-халазальные клетки с крупными ядрами и тонкостенными оболочками располагаются бессистемно, а нуцеллус плавно переходит в халазу без каких-либо структурных особенностей (рис. 1).

Гистохимический анализ. Крупные базальные клетки подиума бедны хроматином, окрашиваются



Рис. 1. Семязачаток *Trollius asiaticus*:

ни – наружный интегумент; ви – внутренний интегумент; ант – антиподы; н – нуцеллус; п – подиум; х – халаза; нк – нуцеллярный колпачок.

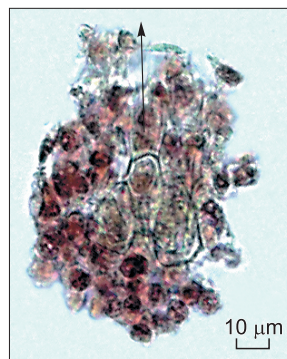


Рис. 2. Начальные стадии формирования базальных клеток подиума на стадии двуядерного зародышевого мешка (его расположение показано стрелкой) у *T. ledebourii*.

Окрашивание – пропионовым кармином.

кармином в желтоватый цвет на всем протяжении своего развития. На ранних стадиях развития (2–4-ядерный ЗМ) эта окраска более яркая (рис. 2). Ко времени созревания ЗМ она тускнеет, и базальные клетки подиума становятся слабо отличимыми от остальных клеток нуцеллуса. В зрелом семязачатке ядерными красителями хорошо прокрашиваются клетки нуцеллярного колпачка (у *T. asiaticus*) и отдельные ядра подиума, почти лишенные вакуолей и цитоплазмы.

АзурII-эозин по Штамму окрашивает внутренние утолщенные оболочки клеток подиума, образующие каркас, в зеленый цвет на всем протяжении его формирования. Такая окраска достаточно четко отличается от неяркой синей (слегка зеленоватой) окраски окружающих клеток (рис. 3). По Р.П. Барыкиной с соавторами (Справочник..., 2004), такая реакция характерна для недревесневших тканей – склерид. Мы

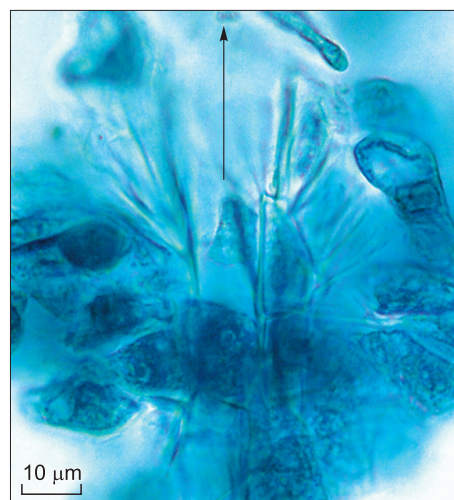


Рис. 3. Каркас подиума.

Окрашивание – азурII-эозином по Штамму.

Стрелкой указано расположение зародышевого мешка.

наблюдало подобное окрашивание у клеток эпидермиса молодого плодолостика, меристематических и проводящих тканей, клеточные стенки которых не содержат клетчатку.

Окраска Конго красным в соляной кислоте также не выявляет целлюлозу в оболочках клеток семязачатка на ранних стадиях. На стадии зрелого ЗМ наблюдается слабая реакция во всех тканях, кроме базальных клеток сложного подиума.

Окрашивание суточным сафранином показало достаточно яркую, но легко вымывающуюся ровную по всей семяпочке окраску, которая более характерна для хроматиновых элементов, чем для лигнина.

Хлор-цинк-йод окрашивает центральные клетки нуцеллуса в желтоватый цвет, эпидермальные – в коричневый, включая эпидермис интегумента; его центральная часть ярко-синяя.

Семязачатки на стадии 2–3-ядерного ЗМ имеют положительную равномерную ШИК-реакцию. В зрелых семязачатках хорошо прокрасились ядра антипод и крупные базальные клетки сложного постамента. Тяжи каркаса сложного подиума ШИК-отрицательны.

Тяжи каркаса окрашиваются слабым раствором анилинового синего, что показывает наличие в них каллозы. По мере развития ЗМ каллоза остается только в верхней части каркаса около антипод. В оболочках других клеток сложного подиума реакция на каллозу отрицательная.

Судан III дал ровную бледную окраску по всему семязачатку. Окраска тяжей каркаса более бледная, что свидетельствует об отсутствии в их составе липидов.

Таким образом, в клеточных стенках интегументов зрелых семязачатков откладывается целлюлоза, тяжи каркаса в районе их прилегания к антиподам и чуть выше имеют в своем составе каллозу весь период созревания ЗМ. Слабо выраженные процессы лигнификации наблюдаются на поздних стадиях развития семязачатка в базальных клетках подиума. При этом дальнейшего, не связанного с формированием тяжей каркаса, утолщения клеточных стенок не происходит. Общая сумма нерастворимых полисахаридов выявилась в содержимом базальных клеток подиума, где этот показатель увеличивается по мере созревания ЗМ. Тяжи каркаса не содержат полисахариды, за исключением их верхней части, где присутствует каллоза. В базальных клетках подиума ко времени созревания ЗМ и позже сумма нерастворимых полисахаридов увеличивается, но целлюлоза не откладывается.

При окрашивании на ДНК/РНК метиловым зеленым пиронином вся структура подиума и нижняя часть антипод окрасилась в ярко-синий цвет. В остальных частях семязачатка окраска красно-розовая или слегка фиолетово-розовая. Это свидетельствует

о высокой активности процессов синтеза ДНК в этой зоне и особенно в районе антиподиальных гаусторий в период созревания ЗМ. Интересен факт отсутствия реакции на ДНК в районе синергид и в яйцеклетке у *T. ledebourii*.

Желтоватая окраска клеток семязачатка была отмечена П. Магешвари (1954) для гипостаза, к сожалению, без указания видов, у которых она обнаружена и использованного красителя. Однако мы не обозначили термином “гипостаза” крупные базальные клетки под антиподами у купальниц, поскольку они имеют нуцеллярное происхождение. А в районе перехода нуцеллуса в халазу, где обычно описывают гипостаза, отсутствуют какие-либо специфические гистохимические реакции.

Также не обнаружено какой-либо морфологической специализации клеток, расположенных непосредственно в зоне оснований интегументов, нуцеллуса и халазы. Из чего делаем вывод, что классическая гипостаза нуцеллярно-халазального происхождения с утолщенными одревесневшими, кутинизированными, лигнифицированными или опробковевшими клетками (Поддубная-Арнольди, 1976) в основании интегументов у купальниц отсутствует.

Халазальную структуру нуцеллуса у купальниц мы идентифицировали как подиум, поскольку она бочкаловидно облегает антиподы, но не вдается в ЗМ. Последнее характерно для постамента (Дальгрэн, 1940: цит. по Rudall, 1980; Unal, Vardar, 2006). Своеобразие подиума купальниц заключается в том, что он состоит из клеток, имеющих некоторые морфологические различия, однако они тесно сцеплены между собой тяжами каркаса и одинаково окрашиваются красителем на ДНК/ДНК метиловым зеленым пиронином. Все это свидетельствует о выполнении ими единой функции. По данным признакам подиум купальниц имеет более сложное строение по сравнению с аналогичной структурой, описанной у других видов (Шамров, 1994). К моменту созревания ЗМ его связь с каркасом разрушается. Большая часть клеток носит следы дегенерации, другие имеют плотные, хорошо прокрашиваемые ядра.

По всей видимости, одной из важнейших функций такого сложного подиума является синтез и транспорт ДНК, а также обеспечение некоторой подвижности генеративных элементов ЗМ и прилегающих к нему клеток нуцеллуса, характерного для купальниц (Буглова, 2009).

Автор благодарна сотрудникам лаборатории репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН, Е.В. Андроновой и Г.Ю. Виноградовой за всестороннюю помощь и советы по ходу выполнения работы; А.А. Красникову за помощь в работе с микротехникой в ЦКП ЦСБС СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

- Буглова Л.В. О перемещении клеток зародышевого мешка у Купальницы Ледебура (*Trollius ledebourii* Reichenb.) // Проблема и стратегия сохранения биоразнообразия растительного мира Северной Азии / Материалы конф. Новосибирск, 2009. С. 32–33.
- Дженсен У. Ботаническая гистохимия. М., 1965. 380 с.
- Магешвари П. Эмбриология покрытосеменных. М., 1954. 440 с.
- Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. М., 1976. 507 с.
- Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. М., 1960. 199 с.
- Соколовская Т.Б. Семейство *Ranunculaceae* // Сравнительная эмбриология цветковых растений. *Winteraceae–Juglandaceae*. Л., 1981. С. 130–138.
- Справочник по ботанической микротехнике / Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. М., 2004. 312 с.
- Шамров И.И. Подиум. Постамент // Эмбриология цветковых растений. Термины и концепции. СПб., 1994. Т. 1. С. 169–172.
- Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. М., 2008. 350 с.
- Bhandari N.N., Kapil R.N. Studies in the family *Ranunculaceae*. VII. Two types of Embryo Sacs in *Trollius* // Linn. Beitr. Biol. Pflanzen. 1964. V. 40, N 1. P. 113–120.
- Rudall P.J. The nucellus and chalasa in Monocotyledons: Structure and Systematics // The Bot. Rev. 1997. V. 63, N 2. P. 140–181.
- Unal M., Vardar F. Embryological analysis of *Consolida regalis* L. (*Ranunculaceae*) // Acta Biol. Cracoviensa: Ser. Bot. 2006. V. 48, N 1. P. 27–32.