

ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВ *IRIS* L. ПОДРОДА *LIMNIRIS* (TAUSCH) SPACH

Дорофеева М.М.

ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15), e-mail: info@psu.ru

Для изучения мегароспорогенеза, мегаметогенеза, процесса оплодотворения и эмбриогенеза *Iris pseudacorus* L., *I. sanguinea* Hornem., *I. setosa* Pall. ex Link and *I. sibirica* L. использовали общепринятую цитоэмбриологическую методику с использованием парафиновых срезов. Эмбриологические данные: завязи трехгнездные, семязачатки с центрально-угловой плацентацией, анатропные, двупокровные и крассинуцеллятные. Археспориальная клетка делится периклинально, образуя париетальную и спорогенную клетки (последняя в дальнейшем преобразуется в мегаспороцит). После мейоза образуется линейная тетрада макроспор. Халазальная мегаспора развивается в зародышевый мешок Polygonum-типа. Анализ строения и развития семязачатков позволяет выделить следующие диагностические эмбриологические признаки: наличие или отсутствие радиально удлинённых клеток внутреннего интегумента, выстилающих микропиле, длина наружного интегумента относительно внутреннего, увеличение числа антипод, сохранение или дегенерация синергид и антипод после оплодотворения.

Ключевые слова: репродуктивная биология, эмбриология, семязачаток, зародышевый мешок, зародыш, *Iris*.

EMBRYOLOGICAL STUDY RESEARCH OF SPECIES OF *IRIS* L. SUBGENUS *LIMNIRIS* (TAUSCH) SPACH

Dorofeeva M.M.

Perm State National Research University, Perm, Russia (614990, Perm, street Bukireva, 15, e-mail: info@psu.ru)

Sporogenesis, gametogenesis, fertilization and embryogenesis of *Iris pseudacorus* L., *I. sanguinea* Hornem., *I. setosa* Pall. ex Link and *I. sibirica* L. were observed using the normal paraffin method. The results are as follows: the ovary is trilocular with axile placenta, the ovule is anatropous, bitegmic and crassinucellate. The archesporial cell below the nucellar epidermis undergoes periclinal division producing the primary parietal and the primary sporogenous cells. Successive cytokinesis in the megasporocyte usually produces tetrad, and the chalazal megaspore of the tetrad develops into a Polygonum-type embryo sac. Analysis of the structure and development of ovules reveals the following diagnostic embryological features: the presence or absence in micropyle radially elongated epidermal cells glandular in appearance, ratio of length of the outer and inner integument, increasing the number of antipodals, persistence of synergids and antipodals after fertilization.

Keywords: reproductive biology, embryology, ovule, embryo sac, embryo, *Iris*.

Введение

Исследованные виды *Iris* относятся к подроду *Limniris* (Tausch) Spach, секции *Limniris* Tausch., *I. sibirica* и *I. sanguinea* к серии *Sibiricae* (Diels) Lawrence, подсерии *Sibiricae*. *I. pseudacorus* к серии *Laevigatae* (Diels) Lawrence, *I. setosa* к серии *Tripetalae* (Diels) Lawrence [5].

Подрод *Limniris*, объединяющий более 45 видов, считается наиболее неоднородным по составу [3; 6]. Несмотря на то что многие виды подрода *Limniris* активно изучаются в систематическом отношении, репродуктивные системы остаются мало изученными или не изучены совсем.

Признаки репродуктивных органов, прежде всего данные об особенностях строения семязачатка, используются в качестве надежных критериев при выяснении дискуссионных

вопросов систематики, филогении и эволюции цветковых растений. Структуры семязачатка, а также процессы их становления устойчивы, консервативны, мало зависят от изменений среды, а значит, особенно важны для целей систематики [4].

При моделировании филогенетических связей рода *Iris* в качестве диагностических эмбриологических признаков используются форма пыльцевых зерен, скульптура экзины, характер поверхности мембраны [2]. Структурам семязачатка же до сих пор уделяется недостаточно внимания.

Материал и методы

Объектами исследования являлись виды рода *Iris*: *I. pseudacorus* L. – и. ложноаирный, *I. sanguinea* Hornem. – и. кроваво-красный, *I. setosa* Pall. ex Link – и. щетиноносный, *I. sibirica* L. – и. сибирский. Исследования проведены в 2011-2013 гг. Сбор материала проводился в Пермском крае в местах естественного произрастания *I. sibirica* и в Ботаническом саду Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН, за что мы выражаем благодарность куратору коллекции касатиковых Н.Б. Алексеевой.

Для изучения начальных этапов развития семязачатков фиксировались бутоны на разных стадиях развития с использованием фиксатора Кларка. Для изучения мегаметогенеза, процесса оплодотворения, эмбрио- и эндосперматогенеза использовали метод темпоральных фиксаций, а также фиксацию завязей на разных стадиях развития после естественного опыления цветков. Фиксация завязей проводилась в фиксаторе Навашина. Проводка зафиксированного материала и парафинирование проводились по общепринятой методике. Окрашивание срезов проводилось с помощью галлоцианина – хромовых квасцов и методом тройного окрашивания [1].

Результаты

Гинецей изученных видов синкарпный, завязь нижняя. Семязачатки расположены попарно, в шахматном порядке в каждом из трех гнезд коробочки и имеют центрально-угловую плацентацию. У *I. setosa* отмечены единичные случаи расположения семязачатков по трое.

Мегаспорогенез у изученных видов начинается на стадии, когда ось нуцеллуса и микропиле семязачатка расположена параллельно по отношению к плаценте. Внутренний интегумент двухслойный, не выходит за пределы нуцеллуса. Наружный интегумент трехслойный, короче внутреннего. Эпидермальные клетки в основе фуникулуса радиально удлиняются, вакуолизируются, образуя фуникулярный обтуратор. Археспориальная клетка делится периклинально, отделяя париетальную клетку и мегаспороцит. Мегаспороцит характеризуется крупным ядром, плотной цитоплазмой и легко отличим от других нуцеллярных клеток. Мегаспороцит претерпевает два последующих деления мейоза,

сопровождающихся цитокинезом, в результате чего образуется тетрада макроспор. Мейоз в мегаспороците *I. setosa* начинается одновременно с антиклинальным делением париетальной клетки.

После первого мейотического деления мегаспороцита образуются диада макроспор. У *I. setosa* и *I. sibirica* первая перегородка закладывается высоко, образуя две неравные клетки. У *I. sanguinea* диада состоит из равных клеток. К этому времени париетальные клетки делятся периклинально, образуя два ряда. У *I. sanguinea* можно наблюдать до 4 париетальных слоев. Это позволяет охарактеризовать семязачатки изученных видов как красинуцеллятные.

После второго мейотического деления образуется линейная тетрада мегаспор. У всех изученных видов халазальная мегаспора оказывается более крупной, с большим содержанием цитоплазмы и несколько более крупным ядром, чем у остальных сестринских клеток тетрады. У *I. setosa* и *I. sanguinea* в одной завязи можно наблюдать семязачатки как на стадии мегаспороцита, так и семязачатки, в которых уже завершилось образование тетрады мегаспор после второго деления мейоза. Микропилярные мегаспоры дегенерируют и отмирают, а затем поглощаются развивающимся зародышевым мешком.

Халазальная мегаспора увеличивается, вакуолизируется и становится инициальной клеткой зародышевого мешка. Внутренний интегумент вытягивается за счет антиклинальных делений и выходит за пределы нуцеллуса. Наружный интегумент также удлиняется. Из-за неравномерного роста в области прикрепления интегументов семязачатки становятся анатропными.

После первого митотического деления образуется двуядерный ценоцит, ядра которого расходятся к полюсам зародышевого мешка. Деление ядер сопровождается образованием центральной вакуоли. Клетки париетальной ткани продолжают сдавливаться и дегенерировать (рис. 1). В результате второго митотического деления образуется четырехъядерный ценоцит (рис. 2).

Ядра остаются на полюсах и снова делятся митотически, в результате чего образуется 8-ядерный ценоцит. С прекращением митотических делений в микропилярном и халазальном концах зародышевого мешка вокруг полярных групп ядер локализуется цитоплазма и начинается клеткообразование. Период дифференциации элементов зародышевого мешка начинается сразу после клеткообразования и сопровождается интенсивным ростом зародышевого мешка.

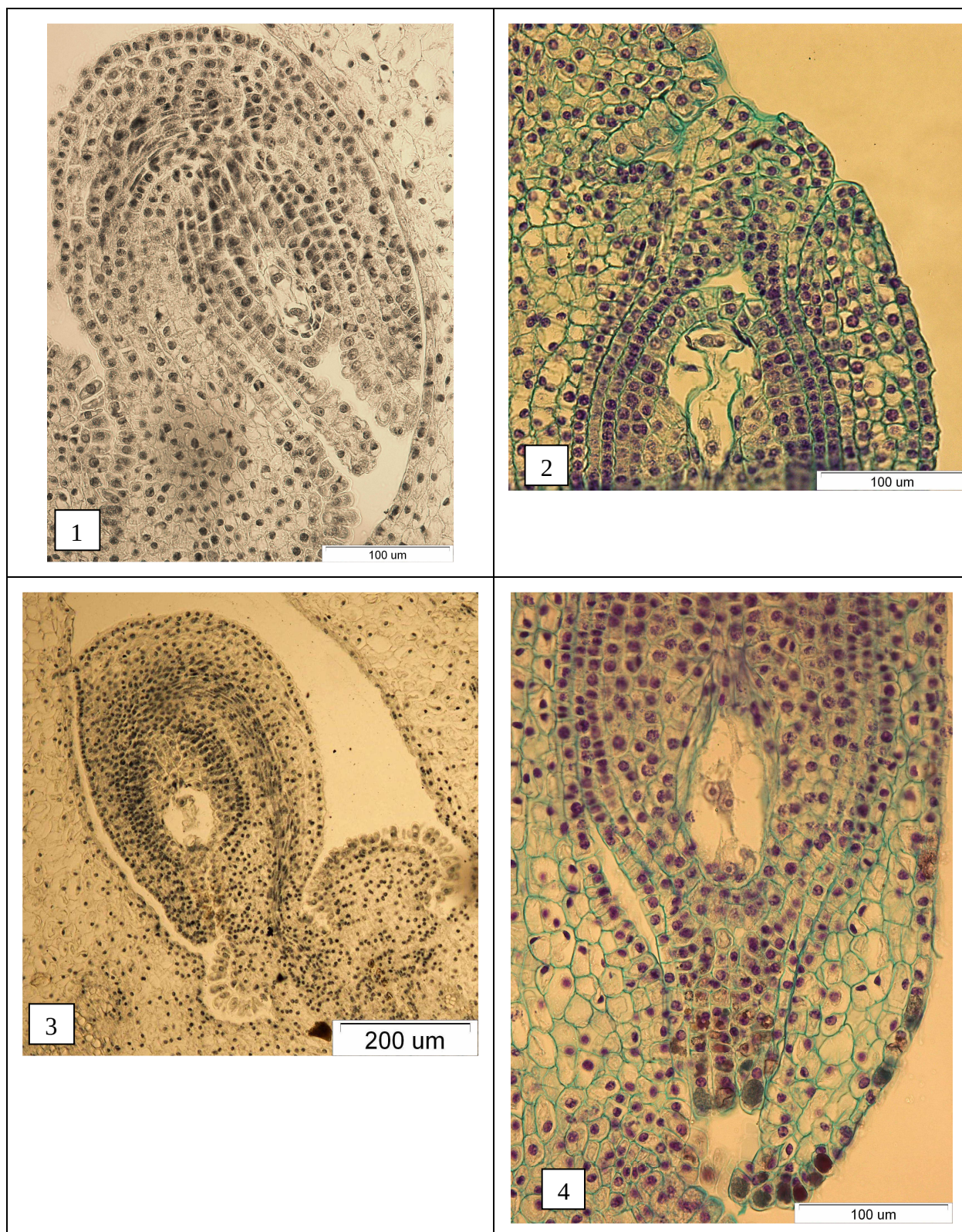


Рис. 1. Семязачаток *I. sibirica* на стадии двуядерного зародышевого мешка. x400.

Рис. 2. Семязачаток *I. pseudacorus* на стадии четырехъядерного зародышевого мешка. x400.

Рис. 3. Семязачаток *I. sanguinea* на стадии зрелого зародышевого мешка. x100.

Рис. 4. Семязачаток *I. setosa* на стадии зрелого зародышевого мешка. x400.

У изученных видов слияние полярных ядер происходит до раскрытия цветка. У *I. sanguinea* и *I. setosa* в одной завязи наблюдаются как семязачатки на стадии сближения полярных ядер, так и семязачатки, в которых уже сформировалось вторичное ядро центральной клетки.

Клетки париетальной ткани, окружающей зародышевый мешок, сдавливаются. Клетки внутреннего интегумента продолжают делиться антиклинально. Проводящая система семязпочек хорошо развита. С ростом и развитием семязачатков проводящий пучок дифференцируется по направлению к халазе. Проводящий пучок состоит из нескольких слоев удлинённых густоплазменных клеток, часть которых затем трансформируется в сосуды с кольчатыми и спиральными утолщениями и образует участки ксилемы. У изученных видов проводящий пучок доходит до халазы (рис. 3).

Внутренний интегумент у изученных видов двухслойный, расширяется в микропилярной части. У *I. pseudacorus* внутренний интегумент на микропилярном конце утолщается до 3-5 слоев, у *I. setosa* – до 6 слоев, у *I. sanguinea* – до 3-5 слоев, у *I. sibirica* до 3 слоев. У *I. sibirica* имеется интегументальный обтуратор – покровные клетки, выстилающие микропиле, крупные, радиально вытянутые, с утолщенными наружными стенками и плотной цитоплазмой.

Наружный интегумент многослойный. У *I. pseudacorus* наружный интегумент 5-7-слойный, короче внутреннего интегумента. У *I. setosa* наружный интегумент 5-6-слойный, длиннее внутреннего интегумента, в области микропиле значительно расширяется до 7-10 слоев и за счет увеличения размеров клеток сужается к краю. У *I. sanguinea* наружный интегумент состоит из 5 слоев, по длине равен внутреннему интегументу. У *I. sibirica* наружный интегумент 4-6-слойный, короче внутреннего интегумента. Микропиле прямое, образовано только внутренним интегументом. Клетки обтуратора имеют утолщенные наружные стенки, плотную цитоплазму. К моменту раскрытия цветка зародышевый мешок у изученных видов состоит из яйцеклетки и двух синергид в микропилярной части, центральной клетки с вторичным ядром, трех антипод в халазальной части (рис. 4).

У *I. sanguinea* центральная клетка расположена вблизи антипод. В некоторых полноценно сформированных семязачатках у *I. sibirica*, *I. sanguinea*, *I. setosa* можно наблюдать аномальное увеличение числа ядер в недоразвитых зародышевых мешках.

Оплодотворение двойное, порогамное. Пыльцевая трубка проходит по микропиле, проникает в одну из синергид и изливает в нее содержимое. После проникновения пыльцевой трубки в зародышевый мешок синергиды начинают деформироваться. Один спермий сливается с яйцеклеткой, формируя зиготу. Другой спермий сливается с центральной клеткой (его ядро объединяется с вторичным ядром), образуя первичную

клетку эндосперма. Первичная клетка эндосперма и зигота проходят короткий период покоя после двойного оплодотворения. Деление ядра первичной клетки эндосперма предшествует делению ядра зиготы.

У *I. setosa* и *I. pseudacorus* деление ядра первичной клетки эндосперма происходит на вторые сутки после опыления. Эндосперм изученных видов нуклеарный. Свободные ядра, имеющие 1-3 ядрышка, связаны между собой тяжами цитоплазмы. *I. pseudacorus* ядра содержат до 7 ядрышек.

Во время первого деления зиготы клеточная перегородка закладывается поперечно. У *I. pseudacorus* и *I. setosa* 2-клеточные зародыши в семязачатках можно наблюдать на шестой день после опыления. У *I. pseudacorus* и *I. sanguinea* синергиды на этой стадии полностью разрушаются. Затем в апикальной клетке закладывается продольная клеточная перегородка, в базальной клетке – поперечная. В 4-клеточном зародыше расположение клеток Т-образное. У *I. setosa* на этой стадии можно различить остатки дегенерирующих синергид. У *I. sibirica* обе синергиды сохраняются вплоть до образования многоядерного нуклеарного эндосперма. Антиподы у *I. pseudacorus* и *I. setosa* сохраняются до образования 4-клеточного зародыша. Антиподы у *I. sanguinea* и *I. sibirica* дегенерируют в начале развития эндосперма. У *I. sibirica* и *I. setosa* наблюдается увеличение числа антипод до четырех.

Таким образом, зародышевые мешки в семязачатках развиваются по Polygonum-типу. Семязачатки крассинуцеллятные, анатропные, битегмальные. В основании фуникулуса имеется область с радиально вытянутыми клетками - обтуратор – ткань секреторного типа, обеспечивающая прохождение пыльцевых трубок в зародышевый мешок.

Заключение

Анализ строения и развития семязачатков *Iris pseudacorus*, *I. setosa*, *I. sanguinea* и *I. sibirica* позволяет выделить следующие эмбриологические признаки в качестве диагностических: наличие или отсутствие радиально удлиненных клеток внутреннего интегумента, выстилающих микропиле, длина наружного интегумента относительно внутреннего, увеличение числа антипод, сохранение или дегенерация синергид и антипод после оплодотворения (табл. 1).

Таблица 1 - Эмбриологические признаки женской генеративной сферы видов рода *Iris* L.

Вид	Внутренний интегумент	Наружный интегумент	Антиподы	Синергиды
Серия <i>Sibiricae</i> (Diels) Lawrence, подсерия <i>Sibiricae</i>				

<i>I. sibirica</i>	На микропилярном конце увеличивается до 3 слоев, имеется интегументальный obturator	4–6-слойный, короче внутреннего	Дегенерируют в начале развития эндосперма, увеличение до 4	Сохраняются до образования многоядерного нуклеарного эндосперма
<i>I. sanguinea</i>	На микропилярном конце увеличивается до 3 слоев	5-слойный, равный внутреннему	Дегенерируют в начале развития эндосперма	Деформируются после проникновения пыльцевой трубки в зародышевый мешок
Серия <i>Tripetalae</i> (Diels) Lawrence				
<i>I. setosa</i>	На микропилярном конце увеличивается до 6 слоев	5–6-слойный, длиннее внутреннего интегумента	Сохраняются до образования 4-клеточного зародыша, увеличение до 4	Деформируются после проникновения пыльцевой трубки в зародышевый мешок
Серия <i>Laevigatae</i> (Diels) Lawrence				
<i>I. pseudacorus</i>	На микропилярном конце увеличивается до 3–5 слоев	5–7-слойный, короче внутреннего	Сохраняются до образования 4-клеточного зародыша	Деформируются после проникновения пыльцевой трубки в зародышевый мешок

Строение семязачатка *I. sibirica* отличает его от других изученных видов подрода *Limniris* наличием интегументального obturatora, сохранением синергид после оплодотворения и увеличением числа антипод до 4. По мнению Макаревича с соавторами [3], *I. sibirica* близок к видам подрода *Xyridion*, а не *Limniris* и, по всей вероятности, наиболее близок к исходному предковому виду. Также авторы отмечают близость *I. setosa* с видами подрода *Iris* и рекомендуют включить его в этот подрод, в то время как во всех современных классификациях он помещен в подрод *Limniris*. У *I. setosa* внешний интегумент длиннее внутреннего, наблюдается увеличение числа антипод до 4 и их сохранение вплоть до начала эмбриогенеза. Указанные выше отличия в развитии женской генеративной сферы, как относительно наиболее консервативной, могут быть использованы для уточнения систематического положения и филогенетических связей видов подрода *Limniris*, наряду с другими таксономическими признаками.

Список литературы

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятова А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. — М. : Изд-во МГУ. — 2004. — 312 с.
2. Доронькин В.М., Байков К.С. Моделирование филогенетических связей сибирских видов рода *Iris* (*Iridaceae*) по методу SYNAP // *Turczaninowia*. — 2004. — Т. 7. - № 2. — С. 45-57.
3. Макаревич И.Ф., Доронькин В.М., Щербик С.В., Блинов А.Г. Филогенетические взаимоотношения сибирских видов рода *Iris* L. (*Iridaceae*), выявленные с помощью RAPD-PCR метода // *Turczaninowia*. — 2001. — Т. 4. - № 4. — С. 80–92.
4. Шамров И.И. Семязачаток цветковых растений: строение, функции, происхождение. - М. : Товарищество научных изданий КМК, 2008. — 350 с.
5. Mathew. B. The Iris. – London, 1981. — 202 pp.
6. Wilson C.A. Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data // *Taxon*. — 2011. — Vol. 60. - No. 1. — P. 27-35.

Рецензенты:

Колясникова Н.Л., д.б.н., доцент, зав. кафедрой ботаники, генетики, физиологии растений и биотехнологий ФГБОУ ВПО «Пермская государственная сельскохозяйственная академия имени Д.Н. Прянишникова», г. Пермь.

Шамров И.И., д.б.н., доцент, зав. кафедрой ботаники РГПУ им. А.И. Герцена, г. Санкт-Петербург.