На правах рукописи

ТОРШИЛОВА АЛЛА АНАТОЛЬЕВНА

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae)

03.00.05 – «Ботаника»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2007

Работа выполнена в Лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН

Научный руководитель доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
Батыгина Татьяна Борисовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
Цвелев Николай Николаевич
доктор биологических наук, профессор
Вишнякова Маргарита Афанасьевна

Ведущая организация Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится **10 октября 2007г.** в **16^{00}** часов на заседании диссертационного совета К 002.211.01 при Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2 (зал Ученого совета).
Тел.: (812) 346-37-42, факс: (812) 234-45-12

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

Автореферат разослан 24 августа 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук О. С. Юдина

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Сохранение биологического разнообразия растений и оценка значимости растительных ресурсов России в настоящее время являются одними из главных задач современной биологии (Буданцев, 1998; Андреев, Горбунов, 2003). Сохранение генофонда ресурсных видов растений связано с успешным протеканием репродукционных процессов, основу которых составляют пыльник, семязачаток, семя. Изучение сопряженности развития структур семязачатка и семени в динамике позволяет выявить определенные морфогенетические корреляции, обуславливающие специфический характер их формирования. Выявление морфогенетических корреляций является полезным для понимания различных отклонений и аномалий, являющихся вероятной причиной снижения семенной продуктивности и появления нежизнеспособных семян и проростков. Таким образом, сохранение и воспроизводство растений невозможно без знания полной картины органо-образовательных процессов, происходящих с момента зарождения организма вплоть до образования им плодов, семян и проростков (Батыгина, 1974, 2004; Никитичева, 1979).

Одним из методов сохранения биоразнообразия и биологических ресурсов является интродукция растений на территории ботанических садов и питомников. Однако успешное семенное и вегетативное размножение вида в условиях интродукции во многом зависит от правильно выбранных условий с учетом специфических особенностей репродуктивной биологии вида.

Репродуктивная биология - одна из быстро развивающихся направлений современной ботаники, возникшей на стыке эмбриологии и ряда ботанических дисциплин (фитоценологии, морфологии, физиологии, генетики и др.), включает в себя широкий диапазон комплексных исследований с целью выявления закономерностей зарождения, развития и существования растительных организмов в различных условиях, а также их способность к размножению (Пономарев, 1969; Батыгина, 1969, 1999, 2000; Левина, 1981; Willson, 1983; Терехин, 1993).

Dioscorea nipponica (сем. Dioscoreaceae) относится к ценным ресурсным видам, является источником стероидных соединений (диосгенина) и основой для синтеза ряда гормональных препаратов (Яковлев, Блинова, 1999). Неконтролируемое использование дикорастущих растений данного вида привело к сокращению численности популяций в ряде районов естественного произрастания (Куренцова, 1973; Денисов, 2005). В связи с этим *D. nipponica* включена в перечень объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу России.

Научный и практический интерес к данному виду, как источнику сырья, возник в России в середине прошлого века. Было проведено изучение некоторых особенностей репродуктивной биологии *D. nipponica* в условиях интродукции (Московская область). Однако попытки создания крупных искусственных популяций столкнулись с рядом проблем: общие низкие темпы развития растения, двудомность и значительное превышение числа мужских особей по отношению к женским в популяциях, недоразвитие зародыша на момент диссеминации, низкая семенная продуктивность. Кроме того, при многократном вегетативном

размножении растений участками корневищ остро встал вопрос об утрате полезных с хозяйственной точки зрения веществ (Грушвицкий, 1961; Герасименко, Тропова, 1966; Даниличева и др., 1971; Даниличева, 1975; Шорина, 1994).

Dioscorea nipponica, как и другие виды рода *Dioscorea*, характеризуется сочетанием некоторого числа морфологических, анатомических, эмбриологических признаков, присущим как однодольным, так и двудольным растениям (Burkill, 1960; Cronquist, 1981; Dahlgren et al., 1985 и др.), в связи с чем детальное изучение различных аспектов его репродуктивной биологии окажется полезным при решении проблем систематики и филогении.

Цель исследования - выявление закономерностей репродукции *Dioscorea nipponica* в местах естественного произрастания (Приморский край) и при интродукции (Ботанический сад БИН РАН, С.-Петербург) в связи с проблемой сохранения вида и оптимизации способов его размножения.

Задачи исследования:

1. Изучить фитоценотические условия произрастания растений *D. nipponica,* их способность к семенному размножению.
2. Выявить специфику развития репродуктивных структур и прохождения эмбриональных процессов (пыльника, семязачатка, семени, микро- и мегаспорогенеза, оплодотворения, эмбриогенеза и эндоспермогенеза) в естественных условиях произрастания и при интродукции.
3. Выявить морфогенетические корреляции и структурно-функциональные особенности в развитии семени.
4. Оценить качество семян из естественных мест произрастания и интродукции на основе: определения степени их выполненности, оптимальных температурных условий для прорастания (тип покоя) и анализа структуры проростков.
5. Выявить способ вегетативного размножения и этапы онтогенеза, на котором осуществляется его реализация.
6. Разработать рекомендации по оптимизации семенного и вегетативного размножения.

Научная новизна. Изучены эколого-фитоценотические условия произрастания вида в двух районах (Уссурийский, Шкотовский) Приморского края, обилие вида и сроки прохождения основных фенофаз (бутонизации, цветения, плодоношения). Впервые проведено сравнительное исследование развития репродуктивных структур у растений *D. nipponica*, произрастающих в естественных условиях и при интродукции (особенности формирования пыльника, семязачатка, семени, микро- и мегаспорогенеза, оплодотворения, эмбрио- и эндоспермогенеза, окружающих структур семени) и выявлены морфогенетические корреляции между ними, обуславливающие нормальное прохождение процессов семенной репродукции. На основании полученных данных дополнена и уточнена эмбриологическая характеристика *D. nipponica* (Dioscoreaceae). Выявлена неустойчивость ряда цитоэмбриологических признаков, которая, вероятно свидетельствует в пользу архаичности данного рода и особого положения семейства Dioscoreaceae - в основании филогенетической системы цветковых растений.

Впервые выявлена гетерогенность семян по морфометрическим показателям, размерам и степени дифференциации зародышей, зависимость процента прорастания семян от данных показателей, уточнен тип покоя семян. Изучены особенности строения семени в связи с явлением доразвития зародыша и выявлен ряд общих признаков для семян, относящихся к этой группе. Изучены также некоторые особенности формирования корневища и способ вегетативного размножения. Данные по репродуктивной биологии могут быть полезны для уточнения спорных вопросов систематики и филогении не только рода *Dioscorea*, но и семейства в целом.

Практическая значимость работы. Выявлены оптимальные эколого-фитоценотические условия произрастания *D. nipponica*, способствующие семенному размножению, условия, при которых семенное размножение затруднено, а также причины низкой семенной продуктивности, в том числе при интродукции. Полученные результаты позволяют в значительной мере скорректировать условия для создания искусственных популяций данного вида. Морфогенетические корреляции и структурно-функциональные аспекты в развитии семязачатка и семени, описанные в работе, позволяют выделить критические стадии развития данного вида с целью управления процессом онтогенеза растения. На основании экспериментальных данных выявлены оптимальные условия для проращивания семян и сформулированы рекомендации для семеноводческих и селекционных целей. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для разработки методик получения сырья в культуре *in vitro*.

Апробация. Материалы, содержащиеся в диссертационной работе, были доложены на XVII International Congress on Sexual Plant Reproduction (Lublin, 2002), на II Международной конференции по анатомии и морфологии растений (Санкт-Петербург, 2002), на XI съезде Русского ботанического общества (Барнаул, 2003), на XI International Conference on Plant Embryology (Brno, 2003), на XVII International Botanical Congress (Vienna, 2005), на I Международной Школе для молодых ученых (Санкт-Петербург, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка литературы (162 наименования, из них 65 на иностранных языках). Работа изложена на 192 страницах, включая 9 таблиц и 31 рисунок.

Содержание работы

Глава I. Обзор литературы

Обзор литературы состоит из 7 разделов. Рассмотрены вопросы систематического положения *D. nipponica,* условий произрастания вида на территории России, морфологии и анатомии вегетативных и репродуктивных органов, эмбриологические аспекты: развитие пыльцевого зерна, зародышевого мешка, строение семени, прорастание семян и формирование проростков. Проанализирован опыт создания искусственных популяций вида вегетативным

способом в условиях интродукции (Московская область и Узбекистан), особенности цветения и плодоношения вида в этих условиях.

Анализ работ по эмбриологии выявил отсутствие данных по развитию стенки пыльника, развитию семязачатка и семени, эмбриогенезу, качеству семян; фрагментарность данных по микроспорогенезу, двойному оплодотворению, эндоспермогенезу, доразвитию зародыша и прорастанию семян. Вопросы, касающиеся способов опыления, природы органов зародыша у представителей рода *Dioscorea* дискуссионны. С практической точки зрения при создании крупных искусственных популяций *D. nipponica* существуют значительные трудности получения необходимого количества семян в связи с низким процентом числа образующихся женских особей.

Глава II. Материал и методы исследования

Геоботанические описания растительных сообществ осуществлялись в Уссурийском и Шкотовском р-нах Приморского края в июне - июле 2000 года. Описания делались на пробных площадях размером 20х20м. Для каждого высотного полога определялось количество стволов по видам, диаметр и высота. Подрост и подлесок оценивались по видам на пробной площади. Фитоценотическая роль видов в травостое оценивалась по шкале Друде. Количество особей *D. nipponica* на единицу площади (в шт. на 1м^2) - обилие вида - определялось путем деления количества растений на пробной площади на размер площади (20м^2), их состояние оценивалось глазомерно. Классификация растительных сообществ проведена на основании эколого–фитоценотических принципов (Нешатаев, 1971, 1986).

Сбор материала для эмбриологических целей производили в естественных условиях в Уссурийском и Шкотовском р-нах Приморского края с июня по сентябрь 2000 года, а также в условиях интродукции на интродукционном питомнике БИН РАН в 2001 году. Материал фиксировали в смеси FAA (70% этиловый спирт, ледяная уксусная кислота, формалин в соотношении 100:7:7). Исследование развития генеративных и репродуктивных структур производилось согласно общепринятой цитоэмбриологической методике (Паушева, 1970). Срезы окрашивали гематоксилином по Гейденгайну с подкраской алциановым синим, а также тройной окраской (кислым фуксином по Фёльгену, гематоксилином Эрлиха, алциановым синим) (Камелина и др. 1992). Оценку внешней морфологии органов цветка, зародыша и проростков проводили с использованием метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и просматривали на микроскопе JSM-35 (Jeol, Hitachi).

Образцы семян для оценки качества семян были собраны в октябре 2002 года в природных популяциях Уссурийского, Лазовского, Ханкайского, Чугуевского р-нов Приморского края и в Ботаническом саду БИН РАН, Санкт-Петербург (семена были получены в семенной лаборатории). Определение морфометрических показателей семян и зародыша проводили под стереоскопическим микроскопом МБС-1 в трех повторностях по 20 шт. каждая. Длина семени определялась вдоль оси микропиле-халаза без учета длины крыла и халазального выроста. Оценку степени

выполненности семян проводили путем взрезывания. Выборка исследованных семян составляла более 1000 шт. для каждого р-на, за исключением Лазовского, в котором было собрано 500 шт. семян. Определение жизнеспособности семян проводили в лабораторных условиях с использованием ростового теста. Мониторинг доразвития зародыша и прорастания семян осуществляли в чашках Петри при трех температурных режимах: 23°С, 9–10°С и 0–3°С. Часть семян выдерживали при температуре 0-3°С, т.е. в условиях холодной стратификации в течение 60 суток, с последующим переносом на 23°С. Опыты проводили в 5-тикратной повторности. Количество проросших семян выражали в процентах от общего числа семян в опыте, с вычислением среднего значения и ошибкой среднего, согласно статистическому методу обработки данных В.Л. Вознесенского (1969). Полученные проростки доводили до ювенильной фазы развития при комнатной температуре (18-20°С) и высаживали в почву.

Глава III. Результаты исследований

1. Условия произрастания и характеристика фитоценозов с участием *Dioscorea nipponica*

В разделе проанализированы 9 растительных сообществ двух районов Приморского края (Уссурийский и Шкотовский). Данные сообщества отличаются расположением (склон или вершина сопки, равнина, межгорное понижение), экспозицией склона, видовым разнообразием, степенью освещенности, обводнённостью почвенного горизонта и др., что определяет различное обилие вида и сроки начала фенофаз (бутонизации, цветения, плодоношения).

Независимо от условий произрастания, во всех приведенных растительных сообществах лиана *D. nipponica* нигде не образует зарослей и представлена, в основном, редкими экземплярами. Вид имеет максимальное обилие (0,4 шт/м^2) и самые благоприятные условия для цветения и вызревания плодов на южных пологих склонах сопок до высоты не более 150-200 м над ур. м. в дубняках леспедециевых из *Querqus mongolica* Fisch., характеризующихся относительно небольшим видовым разнообразием, высокой степенью освещенности, обусловленной низкой сомкнутостью крон древесного яруса (0,6-0,65), невысоким и относительно разреженным подлеском. Почвы слабокислые или почти нейтральные с мощностью гумусового горизонта 3-25 см (Иванов, 1976). Кроме того, успешное вступление в генеративную фазу развития отмечается также на открытых местообитаниях (обычно рудерального типа, а также в «окнах», образованных в результате рубок леса). В начале июля растения там находятся на начальной стадии плодоношения (женские), цветения (мужские). Данные условия произрастания способствуют успешному семенному размножению вида.

Реже всего на исследованных территориях вид встречается в полидоминантных широколиственных и хвойно-широколиственных лесах (обилие вида минимальное - 0,05 шт/м^2), характеризующихся сочетанием таких факторов как: большое видовое разнообразие, низкая освещенность, обусловленная

многоуровневым древесным ярусом и высокой сомкнутостью его крон (0,8-0,9), густым подлеском. Почвы бурые лесные оподзоленные или горные буро-лесные (Иванов, 1976). В таких условиях создаются наименее благоприятные условия для семенного размножения, и преимущественным способом размножения является вегетативный способ. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. **Стадии развития *Dioscorea nipponica* в различных экологических условиях (Приморский край) (лето 2000 года**).

Фитоценоз	Местоположение и экспозиция	Сомкнутость	Обилие вида (кол-во на 1 м^2).	Стадии развития	
				Июнь, 2-я пол.	Июль, 1-я пол.
Дубняк леспедециевый, Уссурийский район	склон сопки, юг	0,65	0,25	генеративная: цветение	генеративная: начальный этап плодоношения
Дубняк леспедециевый, Шкотовский район	склон сопки, юг	0,6	0,4	генеративная: цветение	генеративная: начальный этап плодоношения
Участки нарушенным растительным покровом, опушки леса (открытые местообитания)	пологие склоны территории с преимущ-но южной эксп. и равнины	Нет	не опред.	генеративная: цветение	генеративная: начальный этап плодоношения
Дубняк редкопокровный	подножие склона, юг	0,75	0,1	генеративная: бутонизация	генеративная: цветение
Широколиственный лес с *Fraxinus mandshurica*	межгорное понижение	0,7	0,15	генеративная: бутонизация	генеративная: цветение
Клено-липо-дубняк разнотравно-папоротниково-осоковый	подножие склона, север	0,8	0,1	генеративная: бутонизация	генеративная: цветение
Липо-дубняк разнокустарниковый	вершина сопки	0,8	0,1	вегетативная	вегетативная
Клено-дубо-липняк лиановый редкопокровный	середина склона, север	0,9	0,1	вегетативная	вегетативная
Чернопихтово-широколиственный лес	равнинный участок	0,9	0,05	вегетативная	вегетативная
Хвойно-широколиственный лес с *Pinus coraensis*	склон сопки, север	0,8	не опред.	вегетативная	вегетативная

2. Формирование репродуктивных структур *Dioscorea nipponica* в природных популяциях

2.*1*. Строение мужского цветка. Формирование пыльника, микроспорогенез и развитие пыльцевого зерна

Цветок актиноморфный, трехчленный, содержит 6 тычинок в 2-х кругах по 3. Имеется недоразвитый гинецей. Пыльник 4-гнездный, двухтековый. Тип формирования стенки пыльника - центростремительный, но с различными вариациями с внешней стороны и со стороны связника. С внешней стороны формирование стенки пыльника осуществляется по типовой вариации, со стороны связника - по компликатной (по Терехину и др., 1994). Образование тапетума как с внешней стороны, так и со стороны связника происходит в результате деления клеток париетальных слоёв, различных по происхождению. Тапетум клеточный (секреторный), без реорганизации (по Камелиной, 1978, 1994), двуядерный. Уточнены характеристики сформированной и зрелой стенок гнезда пыльника: с дистальной стороны описания совпадают с литературными данными (Юрцев, Юрцева, 1970), с проксимальной стороны даны впервые. Выявлена неустойчивость типа микроспорогенеза, который в основном симультанного типа, однако в редких случаях присутствует промежуточный тип, а также наряду с изобилатеральными тетрадами микроспор образуются тетраэдральные и Т-образные. Зрелое пыльцевое зерно двуклеточное, однобороздное, основные запасные вещества – крахмал и белки. Вскрывание пыльника интрорзное, осуществляется продольной щелью.

2.*2*. Строение женского цветка. Формирование семязачатка, мегаспорогенез и развитие зародышевого мешка

Цветок актиноморфный, трехчленный, гинецей представлен цилиндрической завязью, коротким столбиком и трехлопастным рыльцем. Завязь нижняя, 3-гнездная, ребристая, плацентация угловая. В цветке имеется 6 недоразвитых тычинок, представленных стаминодиями. По положению в завязи семязачатки апотропные, эпитропные, в редких случаях – плевротропные (по Warming, 1913; Тахтаджяну, 1948). Недоразвитие гнезд завязи и неспецифическая форма семязачатка (ана-кампилотропный) находятся в числе факторов, снижающих семенную продуктивность.

Развитие семязачатка изучено детально с самых ранних стадий до преобразования в семя. На ранних стадиях развития происходит закладка инициалей и дифференциация его основных структур: нуцеллуса, интегументов. В апикальной области нуцеллуса формируется париетальная ткань, разрушающаяся к стадии двуядерного зародышевого мешка, в базальной - формируются инициали постамента и подиума. Инициали подиума примыкают к инициалям гипостазы. Интегументы закладываются на базе общих инициалей с образованием мезохалазы. Внутренний интегумент эпидермального происхождения, образует эндостом, наружный - эпидермально-субэпидермального происхождения. Зрелый семязачаток битегмальный, красстинуцеллятный со структурами нуцеллярного колпачка (2-3-слоя), постамента, подиума, гипостазы (4-5-слоев); Археспорий одноклеточный или многоклеточный, тетрада мегаспор Т-образная, функциональной мегаспорой является халазальная или эпихалазальная мегаспора тетрады.

Зародышевый мешок моноспорический, трехмитозный, биполярный, Polygonum-типа развития. Зрелый зародышевый мешок (по Батыгиной и др., 1982) 7-клеточный, 8-ядерный, округло-цилиндрической формы, с узким вытянутым халазальным концом. Содержит яйцевой аппарат (яйцеклетку и две синергиды с нитчатым аппаратом и клювовидными выростами), центральную клетку с двумя не слившимися полярными ядрами, но находящимися в контакте, как правило, в нижней части зародышевого мешка и три клетки антипод.

2.*3*. Цветение, опыление и процесс оплодотворения

Массовое цветение вида (20-25 июня) приходится на теплый сухой период (температура воздуха составляет 25-27ºС – Уссурийский р-н). Вид является двудомным и характеризуется только перекрестным типом опыления. Данные антэкологических наблюдений свидетельствуют о преимущественно энтомофильном способе переноса пыльцы. Специальных исследований по опылению не проводилось.

Проводниковый тракт пестика включает воспринимающую влажную поверхность рыльца, открытый канал столбика, полость завязи, плацентарный обтуратор, микропиле семязачатка, ткань нуцеллярного колпачка и синергиду зародышевого мешка – конечный элемент проводникового тракта. Продолжительность прогамной фазы составляет 10-15 часов. Деление генеративной клетки (начало профазы) осуществляется в пыльцевой трубке на рыльце пестика, окончание деления (телофаза) – в пыльцевой трубке в верхней части канала столбика. Процессы сингамии и тройного слияния осуществляются по премитотическому типу, при этом процесс сингамии опережает процесс тройного слияния. Завершение процессов – через 22 и 25 часов после опыления соответственно. Особенность прохождения процесса тройного слияния состоит в том, что оно осуществляется в нижней части центральной клетки у входа в узкий халазальный канал. Однако нами отмечены аномальные случаи слияния полярных ядер со спермием в микропилярной части, в непосредственной близости от яйцевого аппарата. При этом образование и деление первичного ядра эндосперма значительно задерживалось (на срок до двух суток). Выявленное отклонение имело следствием нарушение корреляций между сингамией и тройным слиянием (их одновременное начало – вместо асинхронного) и влекло за собой аномалии в развитии эндосперма.

Особенностью процесса оплодотворения является частое вхождение дополнительных пыльцевых трубок в зародышевый мешок, что иногда влечет за собой повреждение второй целой синергиды, которая в норме сохраняется необычно долго, подвергается гипертрофии и очевидно выполняет важную функцию в развитии зародыша. В случае повреждения этой синергиды возможен процесс гибели зародыша. Кроме того, дополнительные пыльцевые трубки приносят дополнительные спермии. Фактов проникновения спермиев в зиготу не отмечено, однако наблюдались случаи их проникновения в центральную клетку зародышевого мешка и вступление в контакт с полярными ядрами. Специфическое аномальное развитие эндосперма, выявленное нами в ряде случаев, позволяет предположить

возможное множественное оплодотворение полярных ядер. Зигота характеризуется крупными размерами, полярностью, формированием полисахаридной оболочки вокруг клетки, содержит крахмал. Процесс созревания зиготы длится двое суток, после чего она приступает к делению.

2.*4.* Формирование семени.

Развитие семени и плода *D. nipponica* в естественных условиях произрастания начинается в конце июня и осуществляется в течение 3,5 месяцев; созревание и диссеминация происходят в конце сентября-начале октября. *D. nipponica* относится к числу видов покрытосеменных растений, характеризующихся явлением доразвития зародыша, и его развитие протекает в 2 этапа: до и после диссеминации. Особенностью развития семени в начале 1 этапа является его уплощение в билатеральной плоскости и неравномерный рост структур (нуцеллуса, гипостазы, интегументов) относительно рафе. В результате этого процесса проводящий пучок семени оказывается расположенным на его плоской дорзальной стороне, следуя по диагонали от микропиле к гипостазе. Такое уплощение и ассиметричный рост семени оказывает влияние на топографию зародыша и эндосперма.

Развитие зародыша.

Первые этапы развития зародыша характеризуются заложением серии наклонных клеточных перегородок. В апикальной части проэмбрио отмечается выделение особых терминальных клеток, отделяющих производные посредством наклонных перегородок и создающих его двурядное строение. Эти клетки напоминают эпифизис зародыша некоторых двудольных. Однако в проэмбрио отсутствует четкая ярусность и не формируются октанты. По характеру положения первых клеточных перегородок (наклонных по отношению друг к другу), специфическому строению тетрады, становлению дорзовентральности, развитие зародыша *D. nipponica* проявляет сходство с таковым злаков, эмбриогенез которых выделен в отдельный Graminad-тип (Батыгина, 1968, 1974, 1987). Однако для окончательного установления типа эмбриогенеза у *Dioscorea* требуются дополнительные исследования. Зародыш на момент диссеминации хорошо дифференцирован на органы: семядолю с расширенной плоской пластинкой и черешком, апекс побега, листовой («чешуевидный») орган на апексе побега, гипокотиль-корневую ось. Данные по генезису так называемого «чешуевидного» органа, интерпретируемого некоторыми авторами (Beccari, 1870; Lawton & Lawton, 1967) как зачаток второй семядоли, показали, что этот орган закладывается позднее семядоли, отделен от нее коротким междоузлием и является производным апикальной меристемы побега, т.е является зачатком первого настоящего листа. Особенностью строения зародыша в зрелом семени также является сохранение в нем функционально активного суспензора, что очевидно связано с его важной ролью в последующем процессе доразвития зародыша.

Развитие эндосперма.

Эндосперм *D. nipponica* нуклеарного типа; однако несмотря на то, что первое и последующие деления не сопровождаются заложением клеточных стенок, некоторые особенности протекания этого процесса свидетельствует о его близости к гелобиальному типу развития. Это проявляется в положении и делении первичного ядра эндосперма, как правило, вблизи антипод, а также в различной судьбе и поведении его производных – перемещении одного из ядер в направлении микропиле и образовании его дериватами основной части ценоцита, при сохранении положения второго ядра в халазальном конце с дальнейшим его участием в образовании группы ядер повышенной плоидности. Одним из признаков эндосперма гелобиального типа является также гаусториальная функция его халазального конца почти на всем протяжении развития.

Общей чертой развития эндосперма у семян с доразвитием зародыша является становление специфической зональности по форме и строению его клеток. Эта зональность проявляется в дифференциации в нем**:** микропилярной зоны с мелкими клетками, в которой начинает формироваться особая эндоспермальная полость, окружающая зародыш; срединной зоны, к которой приурочено накопление основной массы запасных веществ; халазальной зоны воронковидной формы, содержащей клетки с ядрами повышенной плоидности, плотной цитоплазмой, в которых появление запасных веществ отмечается ранее, чем в остальных зонах. Характерно образование единой эндоспермальной полости, в которой расположен зародыш, за счет объединения особой эндоспермальной полости и центральной вакуоли эндосперма, что специфично для некоторых видов с доразвитием зародыша. В зрелом семени эндосперм массивный, основные запасные вещества - крахмал, белок, полисахариды утолщенных клеточных стенок.

Морфогенетические корреляции в развитии зародыша, эндосперма и структур семени.

В ходе развития семени были выявлены морфогенетические корреляции между зародышем, эндоспермом и окружающими структурами семени, связанные со сменой сопряжено функционирующих структур, обеспечивающих развитие зародыша. Анализ корреляций позволил обсудить некоторые структурно-функциональные аспекты: а) трофическую функцию гипертрофированной синергиды, вероятно, подменяющей функцию относительно слабо развитого суспензора в период от оплодотворения до стадии глобулярного зародыша (при достижении суспензором максимального развития, наблюдается дегенерация гипертрофированной синергиды); б) гаусториальную функцию халазального конца эндосперма, начиная со стадии двуклеточного проэмбрио - вплоть до стадии органогенеза в зародыше; в ходе более поздних стадий эмбриогенеза очевидно происходит постепенное снижение этой функции, связанное с усилением накоплением танинов в клетках гипостазы и относительной изоляции нуцеллуса от проводящего пучка семени; в) продолжительное (вплоть до момента диссеминации) функционирование структур подиума, гипостазы, эпидермиса нуцеллуса, нуцеллярного колпачка - звеньев апикального, базального и периферического

транспорта метаболитов (Батыгина, 1984; Шамров, 1998, 2005) к развивающемуся зародышу. Семена эндотестально-экзотегминальные. Клетки экзотегмена имеют мощные утолщения стенок с разветвленными выростами, которые пропитаны танинами – в отличие от эндотегмена, где танины откладываются в вакуолях. Характерно наличие оперкулума. Специализированные структуры халазальной и микропилярной частей семени представлены эпистазой, подиумом и гипостазой. Однако специализация их клеток как элементов семенной кожуры к моменту диссеминации не завершена (о чем в частности свидетельствует лишь их частичное заполнение танинами), что очевидно также связано с последующим процессом доразвития зародыша.

Нарушения морфогенетических корреляций в развитии семени.

Выявленные нарушения морфогенетических корреляций, возможно, находятся в числе факторов, влияющих на снижение качества семян и семенной продуктивности. Это: повреждение интактной гипертрофированний синергиды дополнительными пыльцевыми трубками и вследствие этого - возможная гибель зародыша; изменение локализации полярных ядер центральной клетки и, соответственно, первичного ядра эндосперма, вероятно приводит к иному распределению ядер ценоцита эндосперма, при котором не происходит формирование халазальной зоны ядер и клеток повышенной плоидности. Следует также отметить, что достаточно распространенной аномалией строения семян являлось отсутствие в них зародыша, что коррелировало с отсутствием особой эндоспермальной полости.

3. Формирование репродуктивных структур *Dioscorea nipponica* в условиях интродукции.

Развитие мужских и женских генеративных структур, процесс оплодотворения, эмбриогенез, эндоспермогенез и развитие семени в условиях интродукции протекает сходно с таковыми в естественных условиях произрастания. Однако специфика района Санкт-Петербурга и Ленинградской области (климат, рельеф, почвенно-грунтовые условия) обуславливают появление ряда особенностей репродуктивной биологии вида. Данный регион находится в пределах средней и южной тайги, преобладающим видом является ель европейская, почвы - подзолистые и болотные. Климат атлантико-континентальный с умеренно-холодной зимой и нежарким летом, что обусловлено близостью моря, активной циклонической деятельностью в осенне-зимний период, частой сменой воздушных масс летом (Буданцев, 2006). Все это приводит к неустойчивости и непредсказуемости погоды из года в год. Периодические наступления оттепелей в декабре и значительные понижения температуры в июне и в начале осени, короткий вегетационный период, составляющий около 115 дней (Миронова, Слепян, 1983) оказывают влияние на сроки прохождения фенофаз, антэкологию и диссеминацию *D. nipponica*. Так, в 2001 году наблюдались сдвиги сроков начала бутонизации (на 5 дней), пика массового

цветения (на 10 дней) и начала плодоношения (на 20 дней) в сторону запаздывания по сравнению с естественными условиями произрастания (таблица 2).

Таблица 2. Соотношение сроков фенофаз Dioscorea nipponica в Приморском крае (открытые местообитания) и в условиях интродукции (Ботанический сад БИН РАН, Санкт-Петербург)

Фенофазы	Приморский край		С-Петербург	
	♂	♀	♂	♀
начало бутонизации	5-8. 06.	12-15. 06.	10-12. 06.	17-20. 06.
массовое цветение	24-25. 06.	24-25. 06.	5-10. 07.	7-10. 07.
начало плодоношения		25-30. 06.		13-15. 07.
диссеминация		сентябрь-начало октября		октябрь

Факторами снижения семенной продуктивности в условиях интродукции являются: а) формирование плодов происходит в основном в нижней части соплодий, их развитие в верхней части обычно не наблюдается, вероятно, вследствие нехватки элементов питания в период бутонизации и цветения; б) отмечается неразвитие части семян в плодах в результате отсутствия оплодотворения; в) невыполненность части зрелых семян, образование которых обусловлено нарушениями корреляций, описанными выше. Как показали исследования прогамной фазы и двойного оплодотворения цветков в период массового цветения, большого числа пыльцевых трубок в канале столбика и в завязи не наблюдалось. Более того, часть зародышевых мешков в цветке оказывалась вообще не оплодотворенной, по-видимому из-за нехватки пыльцы. Вследствие этого общее число образующихся семян в плоде в среднем не превышало 3-4-х штук (максимально возможно 6). В октябре отмечалось нарушение процесса диссеминации вследствие невскрывания плодов (причиной этому, вероятно, являлись климатические условия).

4. Оценка качества семян и температурные условия для прохождения латентного периода онтогенеза (доразвитие зародыша и прорастание семян)

4.*1*. Сравнительная морфометрическая оценка семян.

Независимо от места произрастания вид характеризуется четко выраженной гетерогенностью семян по морфометрическим показателям (длине, ширине и массе семени), размерам зародышей и степени их дифференциации, а также степени выполненности и повреждения насекомыми. Это позволяет выделить 4 фракции семян - крупно- и мелкосемянную (выполненные семена), фракцию щуплых семян, лишенных зародыша и/или эндосперма и фракцию семян, поврежденных насекомыми (табл. 3).

Наибольший процент щуплых и поврежденных насекомыми семян оказался в Уссурийском районе (70,1% и 8% соответственно), что говорит о низкой семенной продуктивности *Dioscorea nipponica* в данном районе.

Таблица 3. **Морфометрические показатели семян *Dioscorea nipponica* из различных районов произрастания.**

Районы обследования	Фракция семян	% от общ. кол-ва семян	Длина семени, мм	Ширина семени, мм	Вес тыс. сем мг
Уссурийский район, дубняки, территории с нарушенным растительным покровом	I (крупные)	12,1	4,25±0,12	5,99±0,18	125
	II (мелкие)	9,8	3,10±0,08	4,87±0,08	97,56
	III (щуплые)	70,1			
	IV (поврежд.)	8,0			
Лазовский район, леса с *Fraxinus mandshurica*, вторичные ивовые леса	I (крупные)	49,3	4,08±0,06	6,25±0,1	116,28
	II (мелкие)	10,7	3,18±0,06	5,26±0,06	95,5
	III (щуплые)	36,2			
	IV (поврежд.)	3,8			
Чугуевский район, хвойно-широколиственные леса, территории с нарушенным растительным покровом	I (крупные)	62,7	3,38±0,06	5,41±0,07	
	II (мелкие)	36,7	3,36±0,12	4,48±0,1	
	III (щуплые)	0,43			
	IV (поврежд.)	0,14			
Ханкайский район, заросли ивы западного побережья озера Ханка	I (крупные)	50,8	3,31±0,12	5,62±0,09	
	II (мелкие)	12,8	3,02±0,08	4,26±0,09	
	III (щуплые)	35			
	IV (поврежд.)	1,33			
Ботанический сад БИН РАН, С.-Петербург	I (крупные)	51,3	3,64±0,1	5,61±0,11	108,69
	II (мелкие)	48,7	2,68±0,1	4,71±0,1	57,34

Различия в морфометрических показателях семян I и II фракций связаны с различиями в размерах и степени дифференциации содержащихся в них зародышей. В семенах I фракции преобладали крупные зародыши с большей степенью дифференциации органов, с отчетливо различимой под стереоскопическим микроскопом проводящей системой. Зародыши мелких семян (II фракция) отличались меньшими размерами, а также наличием слабо развитой семядоли, почти не дифференцированной на пластинку и черешок и с тяжами прокамбия в зачаточном состоянии. Наиболее четко данная зависимость проявлялась в условиях интродукции (табл. 4).

Таблица 4. **Размер зародыша (длина в мм) в семенах *Dioscorea nipponica* из разных районов произрастания (на момент диссеминации и завершения доразвития при t=23° С)**

Район	На момент диссеминации	На момент окончания доразвития	На момент диссеминации	На момент окончания доразвития
	крупная фракция		мелкая фракция	
Уссурийский	1,11±0,06	2,58±0,17	0,96±0,03	2,16±0,05
Лазовский	1,06±0,03	2,52±0,03	0,93±0,03	2,4±0,15
Ханкайский	0,94±0,04	2,61±0,10	0,85±0,05	2,31±0,13
Чугуевский	0,92±0,03	2,4±0,16	0,79±0,02	1,85±0,15
С.-Петербург	0,9±0,04	2,47±0,14	0,64±0,03	2,27±0,08

4.*2.* Доразвитие зародыша и прорастание семян.

Доразвитие зародыша происходит в течение 10 сут. при температуре 23°С. При температуре 0-3°С доразвитие зародыша не происходит. На момент окончания второго этапа развития семени (доразвитие) отмечается увеличение размеров зародыша (в 2,3-2,7 раза), дифференцирование элементов ксилемы и флоэмы, полное разрушение слоев клеток в микропилярной части эндосперма и значительное увеличение эндоспермальной полости, завершение специализации клеток окружающих структур семени.

Опыты по проращиванию семян показали, что крупные и мелкие семена из разных мест произрастания прорастают при оптимальной температуре 23°С в течение 15 сут. (табл. 5, 6). Разница во всхожести крупных и мелких семян составляла около 10%, за исключением семян из интродукции, где она достигала 50% и более.

Таблица 5. **Прорастание (в %) фракции крупных семян при t=23ºС**

Район	Дни от начала опыта							
	1	3	5	7	9	11	13	15
Уссурийский	0	0	0	4,0±2,3	16,0±4,0	45±3,5	57,5±4,1	66,6±7,0
Ханкайский	0	0	0	43,25±0,9	68,0±1,6	83,2±1,5	89,2±1,9	91,2±1,7
Чугуевский	0	0	0	10,8±1,7	50,8±2,3	88,0±2,6	97,0±1,0	97,3±0,9
С.-Петербург	0	0	0	6±1,2	14,0±1,2	51,0±5,7	73,0±4,7	80,0±4,3

Таблица 6 **Прорастание (в %) фракции мелких семян при t=23ºС**

Район	Дни от начала опыта							
	1	3	5	7	9	11	13	15
Уссурийский	0	0	0	4,0±2,3	30,6±1,3	70,6±5,8	82,6±2,7	85,3±2,7
Ханкайский	0	0	0	39,3±2,9	57,0±2,0	72,3±2,1	81,0±3,3	81,3±3,4
Чугуевский	0	0	0	6,5±1,3	31,7±1,3	82,2±2,6	93,5±1,3	94,2±1,2
С.-Петербург	0	0	0	2,0±1,2	5,0±1,0	9,0±1,9	29,0±3,0	32,0±2,8

Семена *D. nipponica* характеризуются морфологическим покоем, и для их успешного прорастания не требуется предварительная предпосевная подготовка.

Между размерами семян, степенью дифференциации зародыша и конечным процентом прорастания существует зависимость, которая наиболее отчетливо проявляется у семян растений-интродуцентов. Семена крупной фракции имеют преимущественно зародыши с более высокой степенью дифференциации на органы и характеризуются более высоким процентом прорастания.

5. Морфология проростков и переход в ювенильную фазу виргинильного периода онтогенеза.

Прорастание подземное. Пластинка семядоли остается в семени и выполняет гаусториальную функцию. Главный побег растения первого года жизни формирует

корневище; надземная фотосинтезирующая часть представлена первым настоящим листом проростка и боковым побегом, формирующимся из меристемы в пазухе чешуевидного листа. Корневище плагиотропное, представлено укороченными утолщенными междоузлиями (2–3 в естественных условиях, 3–4 – в лабораторных). На его дорзальной поверхности в пазухах чешуевидных листьев формируется система коллатеральных спящих почек (боковых побегов), за счет которых происходит возобновление растения в следующий вегетационный сезон. На вентральной поверхности расположены адвентивные корни.

Переход к ювенильной фазе виргинильного периода начинается с отмирания зародышевых органов и в лабораторных условиях отмечается в период с 75 по 90 дни от начала прорастания. В естественных условиях произрастания этот переход, по-видимому, осуществляется во второй половине вегетационного сезона, который составляет 190 дней.

6. Прохождение дальнейших фаз онтогенеза и способность к вегетативному размножению

Прохождение имматурной и матурной фаз виргинильного периода происходит в течение второго вегетационного сезона, при этом основным критерием перехода из одной фазы в другую является смена характера роста побега - с прямостоячего на вьющийся, и его листорасположения – с ложномутовчатого на очередное. Вступление мужских особей в генеративный период онтогенеза происходит на третий год вегетации, у женских – на четвертый или пятый. Появление способности растений к семенному размножению достигается на 4-5 год жизни, тогда как к вегетативному – намного позднее, в ходе поздних этапов генеративного периода. *D. nipponica* характеризуется неспециализированной формой вегетативного размножения – травматической, редко сенильной партикуляцией.

Глава IV. Обсуждение

В главе проведено сравнение результатов настоящего исследования с имеющимися литературными данными по различным видам рода *Dioscorea,* и выявлено большое сходство в развитии мужских и женских репродуктивных структур у разных видов. Данные, полученные в настоящем исследовании, позволяют уточнить и значительно дополнить цитоэмбриологическую характеристику не только вида *D. nipponica,* но и рода в целом.

У данного вида выявлена неустойчивость ряда цитоэмбриологических признаков: тип цитокинеза при микроспорогенезе, тип тетрад микроспор, тип семязачатков, их положение в завязи, положение полярных ядер центральной клетки в момент оплодотворения и др. Кроме того, развитие зародыша *D. nipponica* (класс однодольных растений) в некотором роде проявляет сходство с развитием зародыша двудольных, несмотря на то, что так называемый «чешуевидный орган», интерпретируемый рядом авторов (Beccari, 1870; R.Lawton, J.Lawton, 1967) как рудимент второй семядоли, ею не является, а является первым листом. Все это,

вероятно, говорит в пользу архаичности рода и особого положения семейства Dioscoreaceae - в основании филогенетической системы цветковых растений.

Рассмотрены вопросы, касающиеся полового диморфизма вида, опыления, активности движения спермиев в зародышевом мешке, однако для окончательного их решения требуются специальные дополнительные исследования.

Обобщены факторы, влияющие на качество семян как в естественных условиях произрастания, так и при интродукции, и сформулированы рекомендации по созданию искусственных популяций вида. При создании искусственных популяций следует учитывать, что получение семенного потомства вида осложнено относительно длительным прегенеративным периодом (3-4 года), а также отсутствием возможности прогнозирования оптимального соотношения мужских и женских особей для получения максимального количества семян. Поэтому перспективными направлениями дальнейших исследований с целью расширенного воспроизводства ресурсов *D. nipponica* являются: 1) разработка методов тиражирования растений *in vitro* с использованием репродуктивных структур, которые позволят ускорить прохождение ранних фаз онтогенеза; 2) изучение механизмов детерминации пола - с целью управления этим процессом в создаваемых искусственных популяциях данного вида.

Выводы

1. Вид *Dioscorea nipponica* произрастает в различных фитоценотических условиях (Приморский край) и представлен, в основном, редкими экземплярами. Наиболее благоприятные условия для семенного размножения (оптимальные сроки вступления особей в генеративное состояние и созревания плодов) создаются в фитоценозах с небольшим видовым разнообразием и высокой степенью освещенности (особенно дубняки леспедециевые).

2. Протекание основных эмбриональных процессов и развитие репродуктивных структур *Dioscorea nipponica* в естественных условиях и при интродукции осуществляется сходно. Выявлен ряд цитоэмбриологических признаков: центростремительный тип формирования стенки пыльника (типовая вариация с дистальной стороны и компликатная вариация - с проксимальной, со стороны связника); симультанный (редко - промежуточный) тип формирования тетрад микроспор; тетраэдральные, изобилатеральные (редко – Т-образные) тетрады микроспор; анатропный (редко – ана-кампилотропный) семязачаток, наличие в семязачатке специализированных структур - нуцеллярного колпачка, постамента, подиума, гипостазы; заложение интегументов происходит на базе общих инициалей (внутренний интегумент дермального, наружный – дермально-субдермального происхождения); двойное оплодотворение премитотического типа; эмбриогенез сходный с Graminad-типом, нуклеарный тип эндосперма, но функционально близкий гелобиальному типу; эндотестально-экзотегминальные семена с оперкулумом, эпистазой, нуцеллярным эпидермисом, подиумом и гипостазой.

3. Анализ морфогенетических корреляций в развитии структур семени позволил выявить следующие структурно-функциональные особенности: трофическую функцию гипертрофированной интактной синергиды и гаусториальную функцию халазальной части эндосперма в раннем и среднем эмбриогенезе; продолжительное (в процессе доразвития зародыша) функционирование структур подиума, гипостазы, эпидермиса нуцеллуса и нуцеллярного колпачка - системы апикального, базального и периферического транспорта метаболитов к развивающемуся зародышу.

4. Независимо от места произрастания семена *D. nipponica* характеризуются гетерогенностью по морфометрическим показателям, степени выполненности и повреждения насекомыми (4 фракции), размерам и степени дифференциации зародышей, явлением доразвития зародыша после диссеминации, морфологическим типом покоя. Оптимальная температура для доразвития зародыша и прорастания семян +23°С, при этом имеется тенденция зависимости между размерами семени, размером и степенью дифференциации зародыша и конечным процентом прорастания, наиболее отчетливо проявляющаяся в условиях интродукции.

5. Вегетативное размножение представлено неспециализированными формами - травматической и сенильной партикуляцией, и реализуется в ходе поздних этапов онтогенеза.

6. Сохранение и расширенное воспроизводство *D. nipponica* в качестве ресурсного вида возможно посредством создания искусственных популяций, которые целесообразно осуществлять в областях с устойчивыми погодными условиями и относительно продолжительным вегетационным периодом. При семенном размножении следует учитывать предложенные рекомендации: использование выполненных семян крупных фракций с более высокой степенью дифференциации зародыша, их проращивание при оптимальной температуре 23 С. Интенсификация вегетативного размножения возможна посредством искусственного деления корневищ на отрезки с учетом полового диморфизма особей.

По материалам диссертации опубликованы работы:

1. Torshilova A.A., Titova G.E., Batygina T.B. Female reproductive structures development and fertilization process in *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Abstracts of XVII International Congress on Sexual Plant Reproduction “Sexual Plant Reproduction in Nature and Laboratory” 9-13 July 2002, Lublin, Poland. P. 164.
2. Торшилова А.А, Титова Г.Е., Батыгина Т.Б. Развитие семязачатка и семени у *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Труды II Международной конференции по анатомии и морфологии растений. 14-18 октября 2002г., Санкт-Петербург, Россия, с.187.

3. Torshilova A.A., Titova G.E., Batygina T.B. Female reproductive structures and seed development in *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Acta Biologica Cracoviensia, ser. Botanica, 2003. Vol. 45/1. P. 149-154.
4. Торшилова А.А., Титова Г.Е, Батыгина Т.Б. Двойное оплодотворение у *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Материалы XI съезда Русского ботанического общества «Ботанические исследования в азиатской России» (18-22 августа 2003 г., Новосибирск-Барнаул). Барнаул, 2003.
5. Torshilova A.A., Titova G.E., Batygina T.B. Double fertilization in *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Abstracts of XI International Conference on Plant Embryology “From Mendel to Molecular Biology”. Sept. 1-3, 2003. Brno, Czech Republic. P. 74.
6. Torshilova A.A., Batygina T.B. Male flower anther wall development in *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Abstracts of XVII International Botanical Congress. 17-23 July 2005. Vienna, Austria. P. 287.
7. Торшилова А.А., Батыгина Т.Б. Развитие стенки пыльника тычиночного цветка *Dioscorea nipponica* (Dioscoreaceae) // Ботанический журнал, 2005. Т. 90. № 8. С. 1208-1215.
8. Torshilova A.A., Batygina T.B. Double fertilization in flowering plants on example of *Dioscorea nipponica* (Dioscoreaceae) // I Международная школа для молодых ученых «Эмбриология и биотехнология». 4-9 декабря 2005. Санкт-Петербург, Россия. P. 55
9. Поздова Л.М., Титова Г.Е., Торшилова А.А. Биология прорастания и качество семян *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Растительные ресурсы. 2005. Вып. 2. С. 53-63.