

А. А. Торшилова, Г. Ю. Виноградова, Г. Е. Титова

Развитие зародышевого мешка у *Dioscorea caucasica* (*Dioscoreaceae*)

A. A. Torshilova, G. Yu. Vinogradova, G. E. Titova

Embryo sac development in *Dioscorea caucasica* (*Dioscoreaceae*)

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
altorsh62@mail.ru

Представлены результаты эмбриологического исследования этапов формирования женского гаметофита у *Dioscorea caucasica* (*Dioscoreaceae*). Впервые установлено, что развитие зародышевого мешка происходит согласно тетраспорическому Drusa-типу. Дана характеристика элементов сформированного и зрелого зародышевого мешка.

Ключевые слова: мегаспорогенез, зародышевый мешок Polygonum-, Drusa-типа, *Dioscorea caucasica*, *Dioscoreaceae*.

Род *Dioscorea* — один из самых крупных родов сем. *Dioscoreaceae*, построение системы которого длительное время является проблематичным вследствие его большого морфологического разнообразия, наличия диэции и других признаков, осложняющих проведение исследований (см. Wilkin et al., 2005). Система рода, его объем и взаимосвязи отдельных таксонов подвергались постоянной ревизии, включая фундаментальные таксономические обработки R. Knuth (1924), I. H. Burkill (1960) и H. Huber (1998), основанные на анализе ряда важнейших морфологических признаков: направления роста выходящего побега, строения подземных органов и семян (формы и положения их крыла). В последние годы система рода также подверглась ревизии с использованием кладистического анализа данных по последовательности ДНК у значительного числа видов, в результате чего было генерировано новое (независимое от морфологии) молекулярно-филогенетическое древо рода *Dioscorea*, подтверждена его монофилия и статус секции *Stenophora* как наиболее примитивной секции рода (Wilkin et al., 2005). Активные исследования с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов были проведены и в системе самой секции *Stenophora* (Kawabe et al., 1997; Gao et al., 2008). Однако построенные на их основе древа по-прежнему являются противоречивыми.

На фоне масштабных исследований морфологии, анатомии и молекулярной филогенетики рода *Dioscorea* в целом и секции *Stenophora* в частности поражает крайняя недостаточность использования эмбриологических данных, имеющих систематическое значение. Из 220 видов рода (по системе Burkill, 1960) эмбриологически изучено только 11 видов, а из приблизительно 30 видов секции *Stenophora* — только 7 видов (Rao, 1953; Guignard, 1963; Takeuchi, Kimura, 1968; Takeuchi, 1971, 1972; Torshilova et al., 2003; Торшилова,

Титова, 2010; Торшилова и др., 2012; и др.). Одним из эмбриологических признаков, важных для систематики цветковых растений, является развитие женского гаметофита (см. Камелина, 2000, 2009). Из 30 видов секции *Stenophora* детальный анализ этого признака проведен лишь у пяти, преимущественно китайских и японских видов. При этом установлена их гетерогенность по этому признаку: наличие моноспорического Polygonum-типа развития зародышевого мешка у одних видов и тетраспорического Drusa-типа — у других (Takeuchi, Kimura, 1968; Takeuchi, 1971, 1972; Torshilova et al., 2003; и др.). Почти не изученными в этом отношении являются виды из Юго-Восточной Азии, а также американские, кавказские и балканские. В частности, для кавказского вида *D. caucasica* Lipsky имеется единственное краткое сообщение о строении женских репродуктивных структур и типе развития зародышевого мешка, определенного как моноспорический Polygonum-тип (Юрцев, Юрцева, 1973), что обуславливает необходимость более детального эмбриологического изучения данного вида. Дополнительная актуальность такого исследования продиктована и тем, что *D. caucasica* является редким третичным реликтом, эндемиком Западного Закавказья с небольшим ареалом (пологие склоны гор вдоль Черноморского побережья от р. Мзымты до р. Кодора — Крылова, 1996) и занесена в Красную книгу РФ (2008). Вследствие этого остро встает вопрос о сохранении вида и разработке методов оптимизации его размножения, что неразрывно связано с изучением особенностей системы репродукции этого вида.

Настоящая работа посвящена анализу этапов формирования зародышевого мешка у *D. caucasica* с целью уточнения типа развития и характеристики его элементов.

Материал и методы

Материал для исследования был собран на территории Эколого-ботанической станции «Пятигорск» Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (Ставропольский край) в конце мая 2009 г. Женские цветки фиксировали в смеси FAA (70%-ный этиловый спирт, ледяная уксусная кислота, формалин в соотношении 100 : 7 : 7). Препараты изготавливали по общепринятой цитоэмбриологической методике (Паушева, 1980). Срезы толщиной 10 мкм были сделаны на микротоме

Microm 325 (Carl Zeiss, Германия), окрашивались сафранином с подкраской алциановым синим. Анализ препаратов проводился с помощью микроскопа AxioPlan 2ie (Carl Zeiss, Германия), фотографии были сделаны фотокамерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия), рисунки выполнены с помощью рисовального аппарата PA-6 на микроскопе Ergaval (Carl Zeiss, Германия).

Результаты исследования

D. caucasica — двудомная многолетняя травянистая лиана. Мужские и женские цветки, собранные в колосовидные соцветия, формируются на разных растениях, причем мужские цветки являются лишь функционально мужскими, как и женские цветки, являющиеся лишь функционально женскими. Функционально женский цветок — актиноморфный, трехчленный, имеет два круга мелких тычинок со стерильными пыльниками, в центре располагается пестик с цилиндрической завязью, коротким столбиком и трехлопастным рыльцем. Завязь нижняя, гинецей синкарпный, состоящий из трех плодолистиков, в каждом из которых развиваются по два анатропных, красинуцеллятных, битегмальных семязачатка.

Археспориальная клетка дифференцируется на ранних этапах оформления примордия семязачатка (рис., 1). При этом, как показали детальные исследования генезиса семязачатка (с использованием метода объемной реконструкции и выявления клеточных линий), инициаль археспориальной клетки имеет эпидермальное происхождение, что выражает некоторое сходство с характером развития лептоспорангиатных папоротников и ранее не отмечалось у покрытосеменных растений (Торшилова и др., 2012). Инициация археспориальной клетки начинается при переходе эпидермальной клетки плаценты (центральной в закладывающемся бугорке примордия) к периклинальному делению. В результате формируются две клетки, верхняя из которых становится эпидермальной клеткой примордия семязачатка, а нижняя — археспориальной клеткой. Далее археспориальная клетка увеличивается в объеме, ее ядро становится крупным по сравнению с ядрами окружающих клеток, цитоплазма — более плотной (рис., 1). По завершении дифференциации археспориальная клетка подвергается новому периклинальному делению, отделяя снаруж паритетальную клетку, а вовнутрь — спорогенную, которая постепенно преобразуется в мегаспороцит (рис., 2). В ходе этого процесса мегаспороцит увеличивается в размере и отчетливо выделяется среди остальных клеток: приобретает плотную цитоплазму без явно выраженных вакуолей и крупное ядро, занимающее центральное положение (рис., 3).

Первое деление мейоза, в которое вступает мегаспороцит, не сопровождается цитокинезом, что приводит к формированию двух ядер, расходящихся к полюсам; при этом объем самой клетки практически не меняется, в результате чего вновь образованные ядра оказываются сближенными; цитоплазма остается плот-

ной, без вакуолей (рис., 4). После завершения первого деления оба ядра приступают ко второму мейотическому делению, которое также происходит без заложения клеточных перегородок. Следует отметить, что фигуры деления микропилярного и халазального ядер взаимно перпендикулярны: микропилярное ядро делится в продольной плоскости, при этом производные ядра расходятся к полюсам удлиняющейся в это время клетки и между ними формируется вакуоль; халазальное ядро делится в поперечном направлении относительно длинной оси клетки, оставаясь при этом в несколько расширенной халазальной части клетки. Следствием такого характера деления ядер во втором мейозе является распределение их производных по формуле $1 + 3$ (рис., 5). Формирующиеся после мейоза четыре ядра располагаются в общей цитоплазме и остаются функциональными, подвергаясь в дальнейшем двум митотическим делениям.

Первое митотическое деление приводит к образованию 8-ядерного ценоцита с расположением двух ядер в микропилярной области и шести ядер в халазальной, выстраивающихся по периферии этой зоны клетки. Центральную область ценоцита занимает крупная вакуоль (рис., 6). Вторым митозом является завершающим, сопровождается заложением перегородок и оформлением клеточной структуры гаметофита. В микропилярной области формируются три клетки яйцевого аппарата и одно ядро центральной клетки; в халазальной — 11 клеток антипод и одно ядро центральной клетки (рис., 7).

Следует отметить, что специализация элементов зародышевого мешка начинается после завершения клеткообразования и особенно быстро проявляется на микропилярном полюсе. Располагающиеся в его основании две грушевидные клетки приобретают черты строения синергид: в их базальной части начинают формироваться нитчатый аппарат, хотя цитоплазма еще остается плотной, без вакуолей, а ядро локализуется в центре. Яйцеклетка, располагающаяся несколько выше основания зародышевого мешка и ближе к латеральной стенке, также рано начинает проявлять черты специализации: увеличивается в размере и становится крупнее синергид, а также приобретает слабую поляризацию — в базальной части формируется небольшая вакуоль, несколько смещающая ядро из центрального положения к апикальному концу клетки (рис., 7).

Центральная клетка — самая крупная клетка зародышевого мешка, занимающая всю его центральную область, — имеет два ядра, изначально расположенные у полюсов клетки; большую часть этой клетки занимает вакуоль.

Одиннадцать клеток антипод располагаются на халазальном полюсе зародышевого мешка в воронковидном углублении, которое формируется в результате лизиса клеток постаменты, расположенных под зародышевым мешком, и роста последнего в этом направлении. При этом антиподы занимают как собственно зауженную часть, так и периферическую зону

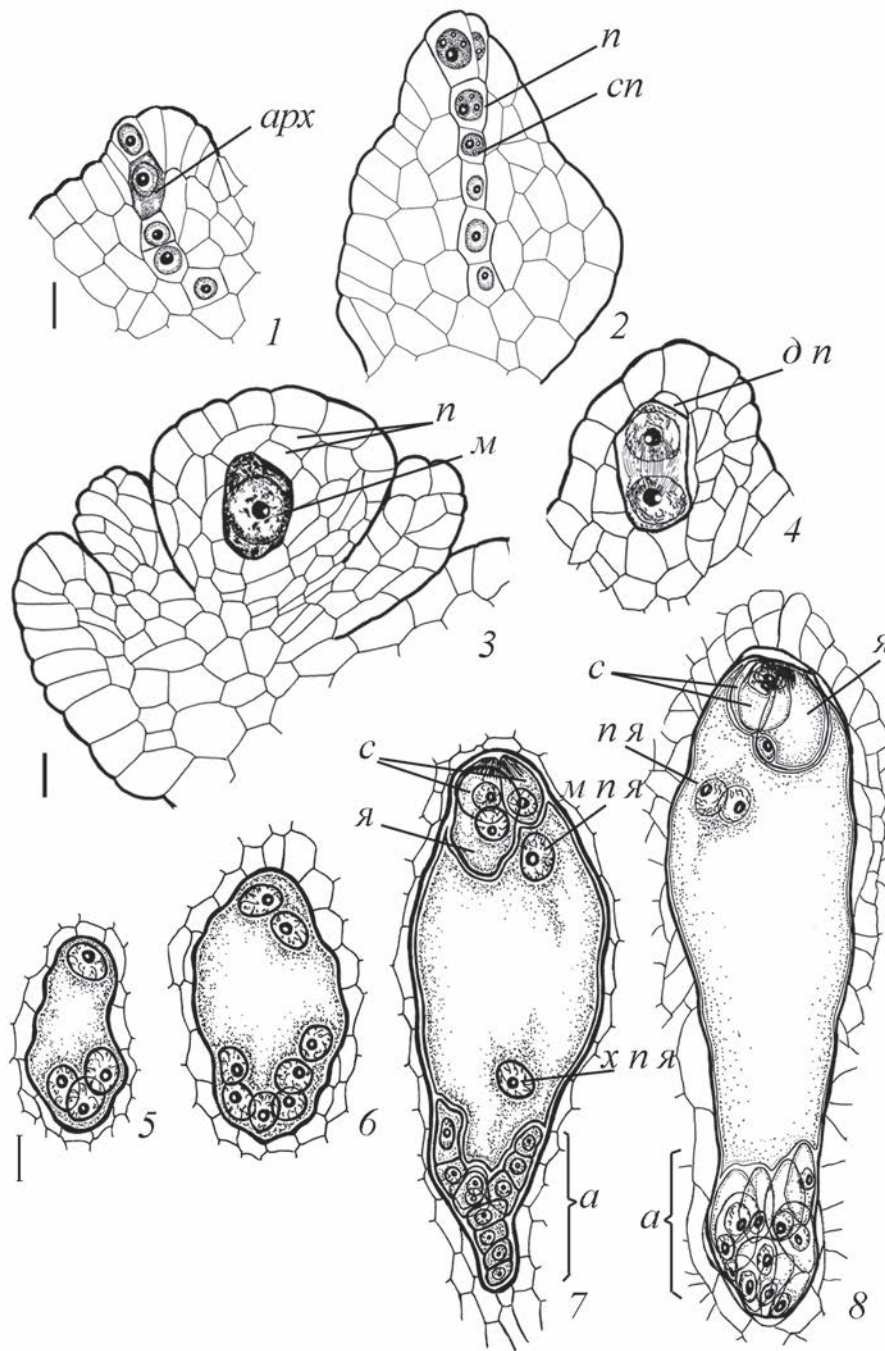


Рис. Развитие зародышевого мешка у *Dioscorea caucasica*.

1 — инициация археспориальной клетки в примордии семязачатка; 2 — примордий на стадии формирования спорогенной клетки; 3 — семязачаток на стадии мегаспороцита; 4 — образование двуядерного ценоцита в результате мейоза I; 5 — окончание мейоза II и образование 4-ядерного зародышевого мешка; 6 — 8-ядерный зародышевый мешок; 7 — сформированный 16-ядерный 15-клеточный зародышевый мешок; 8 — зрелый зародышевый мешок. а — антиподы, арх — археспориальная клетка, дп — дегенерирующая парietальная клетка, м — мегаспороцит, мпн — микропиллярное полярное ядро, н — парietальная клетка, пн — полярные ядра, с — синергиды, сп — спорогенная клетка, хпн — халазальное полярное ядро, я — яйцеклетка. Шкала: 0.01 мм.

халазального конца зародышевого мешка, т. е. 4 клетки располагаются в узком конце, остальные — по краям воронковидного углубления. Изначально эти клетки небольшого размера с плотной цитоплазмой и ядром, локализованным, как правило, в центральной части (рис., 7).

По мере созревания зародышевого мешка происходит его рост и увеличение в объеме, усиливается специализация элементов зародышевого мешка как

на микропиллярном, так и на халазальном полюсе. Синергиды существенно увеличиваются в размере, в их апикальных частях формируются крупные вакуоли, ядра смещаются к базальному полюсу, где располагается нитчатый аппарат (рис., 8). Яйцеклетка также несколько увеличивается в объеме, приобретая вытянуто-овальную форму и становясь при этом сильно поляризованной — ядро смещается в крайнее апикальное положение, базальную и центральную область занима-

ет крупная вакуоль. На халазальном полюсе происходит специализация антипод: с увеличением их размеров в клетках формируются крупные вакуоли, которые смещают ядро на периферию, что создает определенную полярность клеток (рис., 8). Следует отметить, что длительное сохранение этих клеток, а также наличие у них утолщенных оболочек, появляющихся еще на ранних стадиях дифференциации, в совокупности с особым характером их поляризации, вероятно, свидетельствует об активном участии антипод в транспорте питательных веществ в зародышевый мешок. Полярные ядра центральной клетки в процессе созревания зародышевого мешка начинают сближаться, причем их топография в зрелом зародышевом мешке может варьировать. К моменту оплодотворения они могут располагаться у микропиллярного, халазального полюса или в центральной части центральной клетки, находиться в контакте или сливаться во вторичное ядро центральной клетки, что, по-видимому, в дальнейшем влияет на характер образования эндосперма и временные параметры данного процесса.

Таким образом, отсутствие формирования клеточных перегородок после обоих делений мейоза у *D. caucasica* и участие всех его продуктов в формировании зародышевого мешка (четыре ядра, являющихся, по сути, ядрами мегаспор) указывают на его тетраспорическую природу, а специфический характер распределения ядер по окончании мейоза (1 + 3) и наличие двух последующих митотических делений указывают на Drusa-тип развития женского гаметофита у данного вида (по классификации Maheshwari, 1950; Романов, 1971; Печеницын, 1994, 2008; и др.). Сформированный зародышевый мешок у *D. caucasica* 15-клеточный, 16-ядерный; зрелый зародышевый мешок — также 15-клеточный, но 15- или 16-ядерный. Последний состоит из яйцевого аппарата (с типичным характером специализации и поляризации клеток синергид и яйцеклетки), центральной клетки, характеризующейся значительной вариабельностью поведения ее полярных ядер (их расположение в разных частях клетки, сближение, нахождение в контакте или слияние с образованием вторичного ядра центральной клетки), а также мощного антиподального аппарата (11 клеток с утолщенными оболочками и специфической поляризацией, указывающей на возможное направление транспорта метаболитов в зародышевый мешок).

Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют сделать следующие выводы.

1. Зародышевый мешок *Dioscorea caucasica* развивается в соответствии с тетраспорическим Drusa-типом, а не моноспорическим Polygonum-типом, как сообщали В. Н. Юрцев и Н. С. Юрцева (1973). Вероятно, авторы ошибочно интерпретировали как тетраду мегаспор осевой ряд относительно крупных клеток, формирующихся на ранних стадиях и представляю-

щих инициальные клетки основных структур семязачатка, что было выявлено при детальном исследовании генезиса семязачатка *D. caucasica* (Торшилова и др., 2012).

2. Наши данные расширяют представления о диапазоне гетерогенности секции *Stenophora*, а также рода *Dioscorea* в целом по признаку «тип развития зародышевого мешка». К настоящему времени наличие моноспорического Polygonum-типа развития зародышевого мешка в данной секции выявлено у *D. nipponica* Makino, *D. tokoro* Makino (Takeuchi, Kimura, 1968; Torshilova et al., 2003) и *D. quinqueloba* Thunb. (Takeuchi, 1972), а тетраспорического Drusa-типа — у *D. septemloba* Thunb., *D. izuensis* Akahori (Takeuchi, 1971) и *D. caucasica* (ориг. данные), т. е. примерно в равной пропорции из числа исследованных видов. Выявленные различия свидетельствуют о перспективности использования признака «тип развития зародышевого мешка» в качестве диагностического, по крайней мере для дифференциации таксонов на внутрисекционном уровне рода *Dioscorea*. Однако для понимания распределения данного признака и направления эволюции развития гаметофита в пределах рода *Dioscorea* и секции *Stenophora* требуется изучение более широкого спектра видов, особенно из Юго-Восточной Азии, занимающих (по разным системам: Wilkin et al., 2005; Gao et al., 2008) базальное положение в ее филогенетическом древе.

Благодарности

Работа выполнена по плановой теме лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН № 01201255606 при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» № НШ-52.2014.4 (руководитель Т. Б. Батыгина) и Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблема развития» (руководитель Т. Б. Батыгина).

Список литературы

- Камелина О. П. Эмбриологические признаки в филогенетической систематике цветковых растений // Ботан. журн. 2000. Т. 85, № 7. С. 22–33.
- Камелина О. П. Систематическая эмбриология цветковых растений. [Т. 1:] Двудольные. Барнаул, 2009. 501 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Гл. редкол.: Ю. П. Трутнев и др.; Сост. Р. В. Камелин и др. М., 2008. 885 с.
- Крылова И. Л. *Dioscorea caucasica* Lipsky — ареал, морфология, биология и эколого-ценогическая характеристика // Раст. ресурсы. 1996. Вып. 4. С. 1–13.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1980. 255 с.
- Печеницын В. П. Drusa-тип развития зародышевого мешка // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция / Ред. Т. Б. Батыгина. Т. 1: Генеративные органы цветка. СПб., 1994. С. 225–226.
- Печеницын В. П. Эмбриология среднеазиатских видов *Tilipira*. Ташкент, 2008. 150 с.

- Романов И. Д. Типы развития зародышевого мешка покрытосеменных растений // Проблемы эмбриологии. Киев, 1971. С. 72–112.
- Торшилова А. А., Титова Г. Е. Формирование семени и морфогенетические корреляции в развитии его структур у *Dioscorea nipponica* (Dioscoreaceae) // Ботан. журн. 2010. Т. 95, № 1. С. 298–325.
- Торшилова А. А., Рудский И. В., Шамров И. И. К трактовке ранних стадий развития семязачатка *Dioscorea caucasica* (Dioscoreaceae) // Ботан. журн. 2012. Т. 97, № 6. С. 734–743.
- Юрцев В. Н., Юрцева Н. С. Цитоэмбриологическое изучение диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lipsky) // Доклады Тимирязевской с.-х. акад. 1973. Вып. 195. С. 187–193.
- Burkill I. H. The organography and evolution of *Dioscoreaceae*, the family of the Yams // J. Linn. Soc. (Bot.). 1960. Vol. 56, № 367. P. 319–412.
- Gao X., Zhu Y.-P., Wu B.-C., Zhao Y.-M., Chen J.-Q., Hang Y.-Y. Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast matK, rbcL and trnL-F sequences // J. Syst. Evol. 2008. Vol. 46, № 3. P. 315–321.
- Guignard J. L. Embriogenie des Dioscoreacees. Developpement de l'embryon chez le *Tamus communis* L. // Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 1963. T. 256, № 14. P. 3172–3175.
- Huber H. *Dioscoreaceae* // The families and genera of vascular plants. Vol. 3: *Monocotyledons, Liliaceae* (except *Orchidaceae*) // Ed. K. Kubitzki. Berlin, 1998. P. 216–235.
- Kawabe A., Myiashita N. T., Terauchi R. Phylogenetic relationship among the section *Stenophora* in the genus *Dioscorea* based on the analysis of nucleotid sequence variation in the phosphoglucose isomerase (Pgi) locus // Genes Genet. Systems. 1997. Vol. 72. P. 253–262.
- Knuth R. *Dioscoreaceae* // Engler A. Das Pflanzenreich. Bd 4, H. 43. Leipzig, 1924. S. 438–461.
- Maheshwari P. An introduction to the embryology of angiosperms. New York etc., 1950. 453 p.
- Rao N. A. Embryology of *Dioscorea oppositifolia* L. // Phytomorphology. 1953. Vol. 3. P. 121–126.
- Takeuchi Y. Embryo sac development in *Dioscorea izuensis* Aka-hori // Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. 4, Biol. 1971. № 35. P. 225–229.
- Takeuchi Y. Embryo sac development in *Dioscorea japonica* Thunb. // Acta Phytotax. Geobot. 1972. Vol. 25, № 2–3. P. 57–60.
- Takeuchi Y., Kimura C. On the embryo sac formation of *Dioscorea nipponica* Makino and *D. tokoro* Makino // Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. 4, Biol. 1968. № 34. P. 137–140.
- Torshilova A., Titova G., Batygina T. Female reproductive structures and seed development in *Dioscorea nipponica* Makino (Dioscoreaceae) // Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 2003. Vol. 45, № 1. P. 149–154.
- Wilkin P., Schols P., Chase M. W., Chayamarit K., Furness C. A., Huysmans S., Rakotonasolo F., Smets E., Thapayai C. A plastid gene phylogeny of the Yam genus, *Dioscorea*: roots, fruits and Madagascar // Syst. Bot. 2005. Vol. 30, № 4. P. 736–749.