

## МОРФОЛОГІЧНІ, ЦИТОЛОГІЧНІ ТА ГІСТОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕТАПІВ ЕМБРІОГЕНЕЗУ ВИДІВ РОДИНИ *SALICACEAE* MIRB.

*схрещування, запліднення, зародок, ембріогенез, Populus, Salix, Salicaceae*

Раніше проведеними нами дослідженнями було з'ясовано, що у видів родини *Salicaceae* розвиток зародка здійснюється за типами *Asterad* та *Onagrad* [1]. Про наявність *Onagrad*-типу у деяких видів роду *Populus* та інших видів родини *Salicaceae* зазначається і в літературі [11, 14]. Крім того, нами було виділено шість етапів в розвитку зародка [2, 3]. Проте, виділені етапи ембріогенезу недостатньо охарактеризовані в морфологічному, цитологічному та гістологічному відношеннях. Тому питання структурної організації, цитологічної і гістологічної диференціації на різних етапах ембріогенезу вимагає подальшого дослідження. Вивчення цього питання за останній час знайшло своє відображення в літературі.

Так, О. В. Івановська [6] зазначає, що диференціація клітин — це основна проблема ембріології. Ембріологічні дані допомагають краще зрозуміти закономірності диференціації клітин, оскільки в процесі ембріогенезу відбувається закладання ініціалей тканин і органів. Процес закладання примордіїв починається з поділу клітин — з виникнення клітин, що несуть нові якості, які до цього в них були відсутні.

Цей же автор [6], посилаючись на працю Фоскет (Fosket, 1968), який досліджував процес диференціації судинної системи, відмічає, що клітини кори не здатні до безпосередньої трансформації в ксилемні елементи, а повинні пройти через один мітотичний цикл у присутності специфічного стимулятора.

Р. Г. Бутенко [4], на основі досліджень з культури тканин, дійшла подібного висновку. Вона стверджує, що «не сама клітина, яка безпосередньо піддавалася експериментальному впливу, а її «дочірні» та «внучаті» клітини починали диференціюватися. Якщо тим чи іншим способом ці, що передують диференціації поділи, пригнічувалися, то диференціація також не відбувалася». З цього виходить, що включення системи спеціалізації клітини зв'язано з процесом її поділу.

Це знайшло підтвердження в працях Н.П. Дмитрієвої [5] з проблеми регуляції морфогенезу та диференціації в культурі клітин і тканин рослин.

Отже, із сказаного вище можна зробити висновок, що в ембріогенезі рослин закладаються важливі процеси гістогенезу та органогенезу, які реалізуються шляхом диференціації клітин під час їх поділу. Дослідження закономірностей диференціації зародка в процесі його розвитку допоможе селекціонерам з'ясувати причини утворення нежиттєздатного насіння у міжвидовій гібридизації та провести пошук можливих шляхів для подолання цього явища.

Дані про особливості ембріогенезу мають також важливе значення для з'ясування питань систематики, філогенії та селекції покритонасінних рослин [7, 8, 10]. Для видів родів *Populus* і *Salix* знання етапів ембріогенезу необхідні для з'ясування несумісності, яка виявляється на різних етапах формування насіння та плодів, у тому числі і на етапах розвитку зародка. Потреба в таких дослідженнях зростає у зв'язку з широко розгорнутими генетико-селекційними та гібридизаційними роботами з видами родини *Salicaceae*.

Метою нашого дослідження було встановлення морфологічних, цитологічних і гістологічних особливостей та з'ясування органогенних процесів на етапах ембріогенезу видів родів *Populus* і *Salix* родини *Salicaceae*.

## Матеріал і методика досліджень

Об'єктами досліджень були *Populus laurifolia* Ledeb., *P. nigra* L., *P. balsamifera* L., *P. bolleana* Lauche, *P. x canescens* (Ait.) Smith., *P. simonii* Carr., *Salix alba* L., *S. fragilis* L., *S. triandra* L., *S. caprea* L., *Chosenia arbutifolia* (Pall.) A. Severts. Дослідження етапів розвитку зародка проводили у внутрішньовидових схрещуваннях *Populus nigra* x *P. nigra*, *P. balsamifera* x *P. balsamifera*, *P. laurifolia* x *P. laurifolia*, *P. x canescens* x *P. x canescens*, *P. simonii* x *P. simonii*, *Salix alba* x *S. alba*, *S. fragilis* x *S. fragilis*, *S. triandra* x *S. triandra*, *S. caprea* x *S. caprea*, *Chosenia arbutifolia* x *Ch. arbutifolia*. Окремі питання ембріології (розвиток чоловічого і жіночого гаметофітів) вивчали до запилення при штучному виганянні гілок в посудинах із звичайною питною водопровідною водою. При проведенні внутрішньовидових схрещувань дотримувались заходів, що застосовуються в гібридизаційних роботах із тополями [12].

Матеріал для ембріологічного дослідження був зібраний окремо по видах, статі та етапах розвитку зародка. Темпоральну фіксацію досліджуваного матеріалу здійснювали сумішами ЕА4 (10: 7: 7), Карнуа (6: 3: 1) і (3: 1). Навашина (10: 4: 1). Зрізи фарбували залізним гематоксиліном за Гайденгайном, реакцією ШІФФа, застосовували реакцію Фельгена та різні барвники (ліхтерюн, еозин). Преперати виготовляли за загальноприйнятою в цитоембріології методикою [9,13]. Дослідження провадили на мікроскопах МБИ-15 з використанням фазового контрасту та МБИ-3 при збільшенні у 900 та у 1350 разів. Під мікроскопом (окуляр 10, об'єктив 90) візуально досліджували всі етапи ембріогенезу. Найхарактерніші з них замальовували рисувальним апаратом РА-4.

## Результати досліджень та їх обговорення

Перш, ніж перейти до характеристики морфологічних, цитологічних, гістологічних і органогенних особливостей етапів розвитку зародка, коротко зупинимось на процесі ембріогенезу взагалі.

Після завершення процесу запліднення, який у досліджених видів роду *Populus* настає через 20-26, а у видів роду *Salix* — через 24-30 год. після запилення, запліднена яйцеклітина поступово переходить до стану спокою. Ядро зиготи деякий час перебуває в інтерфазному стані, тривалість якого залежить від біологічних особливостей виду та екологічних умов, в яких відбувається ембріональний розвиток. Перший поділ зиготи у видів родів *Populus* і *Salix* приводить до утворення двох генотипно ідентичних клітин, які відрізняються між собою за формою, розмірами та функціонально.

Унаслідок численних мітотичних поділів, зніційованих апікальною клітиною, поступово формується глобулярна структура зародка, вкритого ембріодермою. Такого стану розвитку зародок досягає у різних видів в середньому через 8-12 діб після запилення. Через 10-14 діб в глобулярній структурі відбуваються процеси гістогенезу. Згодом через 14-20 діб після запилення, починається диференціація зародка, внаслідок якої закладаються зачатки сім'ядолей. Одночасно в них спостерігається інтенсивне накопичення запасних поживних речовин. Зрілий зародок у всіх досліджених видів прямий, зеленого кольору, містить хлоропласти та запасні речовини: олії, вуглеводи і білки.

На основі проведеного порівняльного аналізу одержаних результатів у досліджених видів родів *Populus* і *Salix* виділені такі етапи ембріогенезу:  $E_1$  — етап зиготи;  $E_2$  — етап апікальної і базальної клітин;  $E_3$  — етап глобулярного росту;  $E_4$  — етап гістогенезу;  $E_5$  — етап органогенезу;  $E_6$  — етап фізіологічної зрілості зародка.

$E_1$  — етап зиготи. Наступає з моменту завершення процесу об'єднання ядра яйцеклітини зі спермієм і утворення диплоїдного ядра зиготи. На даному етапі відбувається дозрівання зиготи: її цитоплазма ущільнюється, поляризація посилюється, значно збільшуються розміри. Тривалість даного етапу за штучної вигонки гілок у *Populus nigra*, *P. laurifolia*, становить 10-12, у *P. bolleana*, *P. x canescens*, *P. simonii*, *P. balsamifera* — 12-14, у *Salix alba* — 8-10, у *S. fragilis* — 16-18, у *S. caprea*, *S. triandra* — 18-22 год., а в природних умовах у згаданих видів він триває від 20 до 40 год. Весь процес дозрівання зиготи відбувається одночасно з глибокою структурною перебудовою її ядра та підготовкою його до мітотичного поділу. У процесі оптогенезу з одної клітини — зиготи — розвиваються різні клітини, тканини і органи, що

становлять рослинний організм [6]. Після завершення етапу зиготи настає новий етап у розвитку зародка.

$E_2$  — етап утворення апікальної і базальної клітин. Починається тоді, коли зигота після першого мітотичного поділу утворює дві клітини: більшу верхню (са) апікальну (термінальну), звернену у глибину зародкового мішка, і меншу нижню (св) базальну, розташовану ближче до мікропіле (рис. 1). У процесі поділу зиготи чітко прослідковується диференційований мітоз, внаслідок якого утворюються дві генотипово однакові, але функціонально різні клітини [6]. Апікальна і базальні клітини так само, як і зигота, деякий час перебувають у стані спокою. Якщо апікальна клітина після виходу із стану спокою приступає до активних мітотичних поділів, то базальна клітина ще деякий час залишається в інтерфазному стані. Це обумовлено тим, що з апікальної клітини формується власне зародок, а базальна клітина після двох-трьох поділів утворює дво-чотириклітинний підвісок.

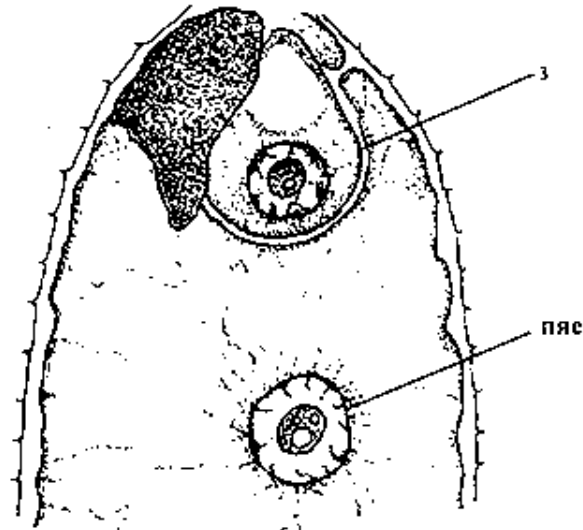


Рис. 1. Зигота та первинне ядро ендосперму у *Populus nigra* в інтерфазному стані: з — зигота; яє — первинне ядро ендосперму (зб. х 900)

Перший поділ зиготи у видів родів *Populus* і *Salix* поперечний. Однак, у *Populus nigra*, *P. x canescens*, *P. simonii* та у *Salix fragilis* і *S. caprea* ми інколи спостерігали закладання не поперечної, а «косой» перетинки, яка займала різне положення (рис. 2, 3). Після цього відбувається поділ апікальної і базальної клітин. Унаслідок численних мітотичних поділів утворюється багатоклітинний зародок. Це свідчить про перехід зародка на наступний етап розвитку.

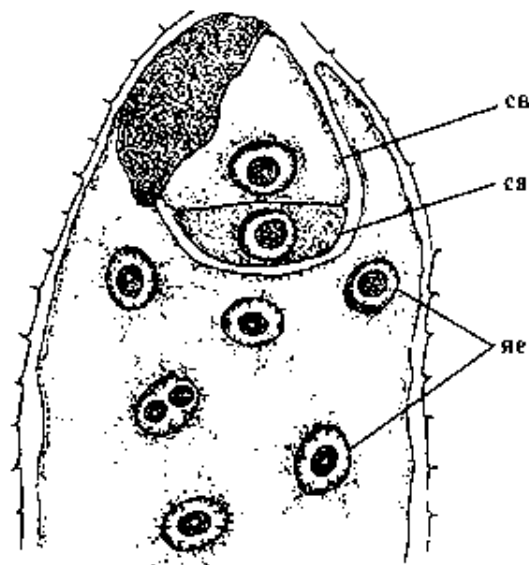


Рис. 2. Поперечний поділ зиготи з утворенням апікальної і базальної клітин у *Populus nigra*: са — апікальна клітина; св — базальна клітина; яє — ядра ендосперму (зб. х 900)

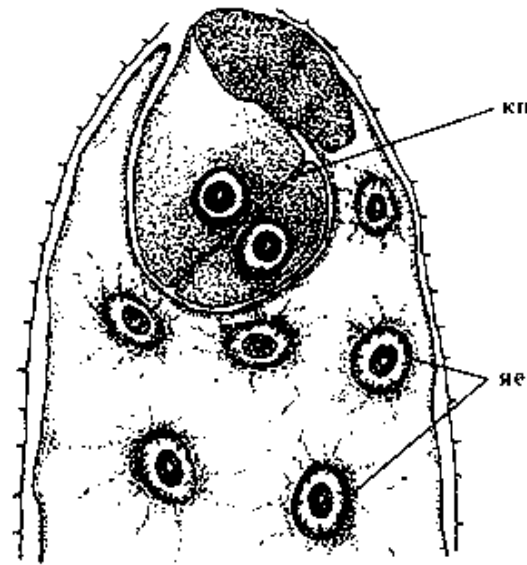


Рис. 3. Закладання «косої» правобічної перетинки під час поділу зиготи у *Populus nigra*: кп — косо перетинка; яе — ядра ендосперму (зб. x 900)

**Е<sub>3</sub>** — етап глобулярного росту. Характеризується тим, що багатоклітинний зародок інтенсивно росте за рахунок активного поділу меристематичних клітин. Мітотичні фігури без певної орієнтації приводять до формування глобулярної структури, клітини якої перебувають в ембріональній фазі індивідуального розвитку. Для клітин, що перебувають на цій фазі розвитку, характерними є такі ознаки: ізодіаметрична форма, ядро округлої форми, розташоване в центрі клітини, наявність тонкої первинної лектиново-целюлозної оболонки, ядерно-цитоплазматичне співвідношення становить від 1/4 до 1/10, клітини інтенсивно дивяться, тривалість онтогенезу клітин вимірюється тривалістю інтерфази тощо. Внаслідок інтенсивного поділу клітин глобулярна структура досягає свого максимального розвитку. Відтак мітотична активність її клітин поступово зменшується. Мітози зовсім не припиняються, але спостерігається просторова переорієнтація веретен поділу. Це свідчить про те, що зародок переходить на новий якісно відмінний етап розвитку.

**Е<sub>4</sub>** — етап гістогенезу. Із зменшенням мітотичної активності в глобулярній структурі спостерігається зміна положень веретен поділу з різновекторного до лінійного їх розташування. Водночас змінюється локалізація мітозів. Якщо на етапі глобулярного розвитку мітози трапляються по всій площі зародка, то на етапі гістогенезу вони, здебільшого, локалізуються в центральній його частині. У цей час веретена поділу поступово переорієнтовуються в напрямку поздовжньої осі зародка (рис. 3). Спрямована орієнтація мітотичних веретен та їх локалізація в тих чи інших ділянках говорить про те, що в цих частинах зародка клітини з ембріональної фази переходять у фазу розтягання, а відтак — у фазу диференціації. Внаслідок таких послідовних цитологічних змін у відповідних місцях зародка з'являються групи клітин, з яких шляхом диференційованих мітозів починають закладатися елементи провідних і меристематичних тканин (анекси стебла і кореня).

Одночасно з цитологічними та гістологічними змінами, що відбуваються в глобулярній структурі, спостерігаються морфологічні зміни зародка, внаслідок чого він поступово набуває грушоподібної форми.

**Е<sub>5</sub>** — етап органогенезу. Починається тоді, коли в апікальній частині грушоподібного зародка з'являються два невеликі меристематичні горбочки — зачатки сім'ядолей. У міру їх подальшого росту формуються дві прями сім'ядолі, між якими закладається зародкове стебельце з апікальною меристемою на верхівці. Водночас з протилежного боку точки росту зародкового стебельця формується зародковий корінець, на кінці якого розташовується його апікальна меристема з ініціальними клітинами, з яких шляхом активних мітотичних поділів згодом утворюється кореневий чохлак. Саме на цьому етапі реалізується програма формування зародкового пагона і зародкового кореня — зачатків вегетативних органів дорослого рослинного організму.

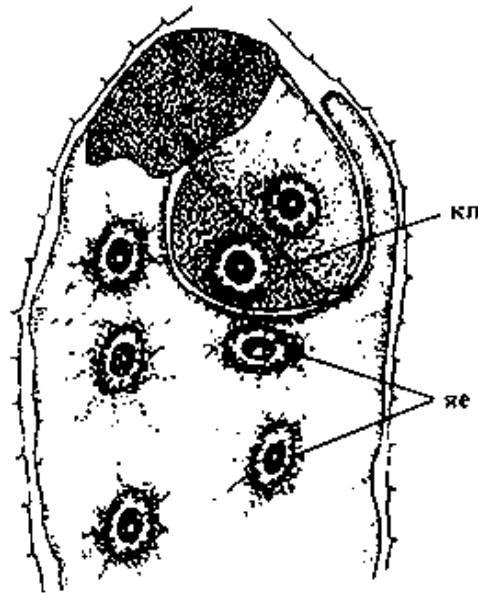


Рис. 4. Закладання «косої» лівобічної перетинки під час поділу зиготи у *Salix caprea*: кл - коса перетинка; яе — ядра ендосперму (зб. x 900)

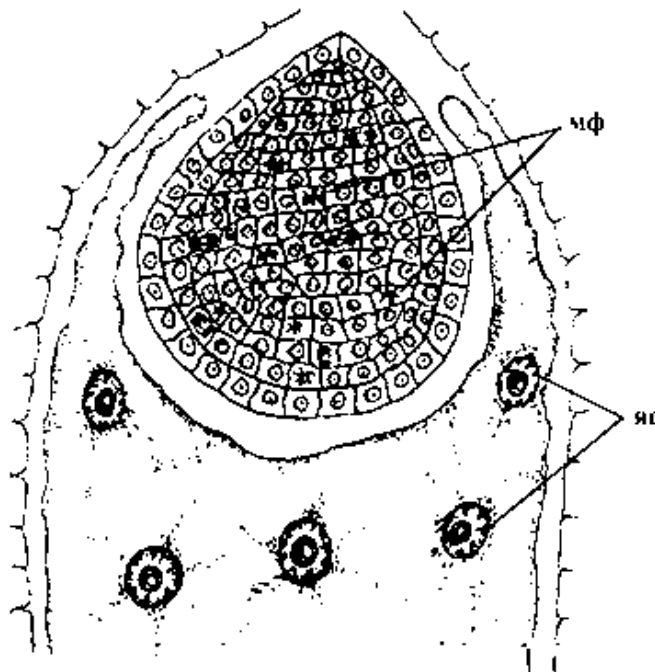


Рис. 5. Мітози в клітинах глобулярного зародка в *Populus nigra*: мф — міотичні фігури; яе — ядра ендосперму (зб. x 600)

**Е<sub>6</sub>** — етап фізіологічної зрілості зародка. Характеризується тим, що в зароді морфологічно сформовані зародковий пагін, що складатиметься із зачаткового стебелця з точкою росту, зачаткових листочків та зародкового корінця з кореневим чохлаком. У такому зароді триває час протікають активні фізіолого-біохімічні процеси, внаслідок яких зарод фізіологічно готується до проростання. Однак, складний процес утворення насінини насінного зачатка ще не завершився і насінні зачатки на даному етапі ембріогенезу фізіологічно з'єднані через плаценту із зав'яззю, з якої до зародків надходять необхідні поживні речовини, що поступово нагромаджуються в її сім'ядолях. Через деякий час в зав'язі залежні від виду утворюється від 6 до 12-14 стиглих насінин, здатних за певних умов проростати і давати початок дорослому рослинному організму.

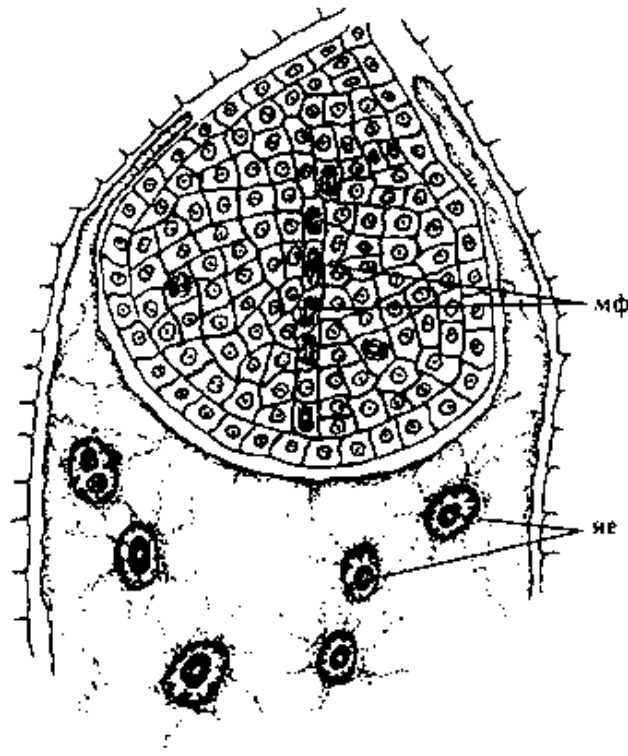


Рис. 6. Локалізація мітозів уздовж поздовжньої осі глобулярного зародка на етапі гістогенезу в *Salix fragilis*: мф — мітозичні фігури; je — ядра ендосперму (зб. x 600)

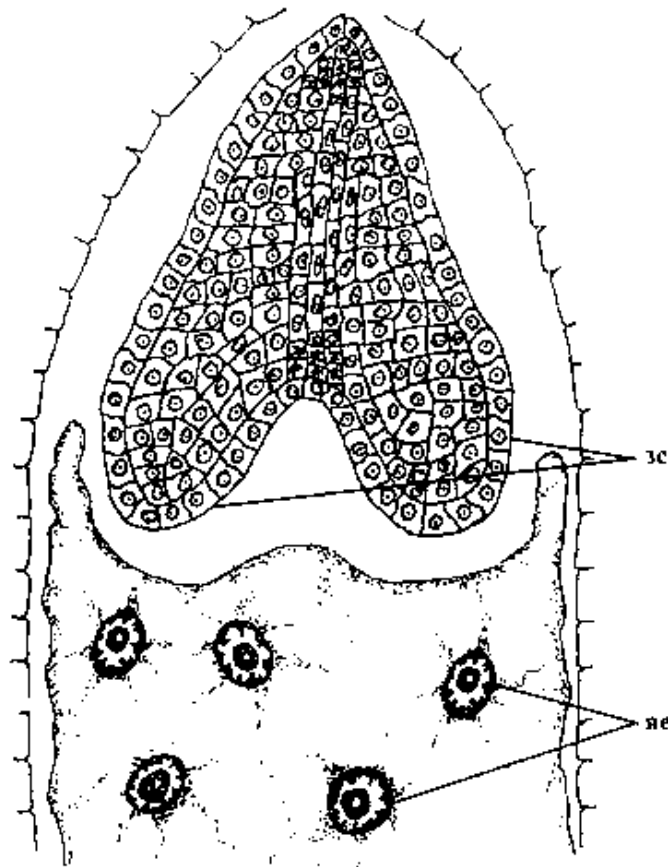


Рис. 7. Закладання зачатків сім'ядолей у *Populus nigra*: зс — зачатки сім'ядолей; je — ядра ендосперму (зб. x 600)

### Висновки

Проведене дослідження ембріогенезу показало, що у видів родів *Populus* і *Salix* родини Salicaceae процес розвитку зародка в цілому протікає подібно. Встановлено шість етапів в розвитку зародка видів родини Salicaceae. Було з'ясовано, що кожний етап характеризується певними морфологічними та цитологічними змінами і гістологічними та органогенними особливостями. На всіх етапах ембріогенезу, починаючи з етапу зиготи і закінчуючи етапом

фізіологічної зрілості, мітко виявляються диференціація і поділи клітин, які приводять до росту та розвитку зародка. Одночасно виявлено, що досліджені види відрізняються за темпами протікання та тривалістю окремих етапів у розвитку зародка. Одержані дані можуть бути використані для з'ясування бар'єрів несумісності, що виявляються на різних етапах ембріогенезу в міжвидовій гібридизації родів *Populus* і *Salix* і пошуку та реалізації можливих шляхів щодо їх подолання.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Барна М. М. Ембріологія видів родини *Salicaceae* Mirb. у зв'язку з їх філогенією та еволюцією. — Укр ботан журн. — 1983. — Т. 40, № 2. — С. 30-36, 42.
2. Барна Н. Н. Сравнительное исследование эмбриогенеза видов семейства *Salicaceae* Mirb. // Труды IX Всесоюзн. совещания по эмбриологии растений "Гаметогенез, оплодотворение и эмбриогенез семених растений, папоротников и мхов". — Кишинев, 1986. — С. 177-178.
3. Барна М. М. Гаметогенез, запліднення та ембріогенез у деяких видів роду *Salix* L. // Матеріали наукових читань, присвячених 100-річчю відкриття подвійного запліднення у покритонасінних рослин професором університету Святого Володимира С.Г. Навашиним. — К.: Фітосоціоцентр, 1998. — С. 8-12.
4. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. — М.: Наука, 1975. — 375 с.
5. Дмитриева Н. П. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений // Культура клеток растений. — М.: Наука, 1981. — С. 67-83.
6. Иванова Е.В. Цитозембриологическое исследование дифференцировки клеток растений. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. — 152 с.
7. Кордюм Е.Л. Значение эмбриологии для решения вопросов систематики и филогении покрытосеменных растений // Проблемы эмбриологии. — Киев: Наук. думка, 1971. — С. 196-216.
8. Кордюм Е. Л. Эволюционная цитозембриология покрытосеменных растений. — Киев: Наук. думка, 1978. — 220 с.
9. Методические указания по цитологической и цитозембриологической технике (для исследования культурных растений) — Абрамова Л. И., Орлова И. Н., Вишнякова М. А., Константинова Л. П., Огородникова В.Ф. Под ред. Л.И.Орлов. — Л.: ВПР, 1982. — 119 с.
10. Поддубная-Арнольди В. А. Цитозембриология покрытосеменных растений. — М.: Наука, 1976. — 507 с.
11. Поддубная-Арнольди В.А. Характеристика семейств покрытосеменных растений по цитозембриологическим признакам. — М.: Наука, 1982. — 352 с.
12. Старова Н.В. Методика селекции и сортоиспытания тополей. — Харьков: УкрНИИЛХА, 1962. — 60 с.
13. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. — М.: Наука, 1979. — 155 с.
14. Nagaraj M. Floral morphology of *Populus deltoides* and *P. tremuloides* // Bot. Gaz. — 1952. — Vol. 114, № 2. — P. 222-243.

*M. M. Barna*

### MORPHOLOGICAL, CYTOLOGICAL AND HISTOLOGICAL FEATURES OF STAGES IN EMBRYOGENESIS OF SPECIES OF FAMILY *SALICACEAE* MIRB.

As a result of the lead researches six stages in development of an embryo of family *Salicaceae*' species appointed. Each stage is characterized certain morphological, cytological and histological features. The obtained data can be utilised for definition of barriers of incompatibility, which appear at different stages of an embryogenesis at an interspecific hybridization in genera *Populus* and *Salix* of family *Salicaceae*.

*Надійшла 18.10.2000*