

Г. В. Зуева

**ОПЛОДОТВОРЕНИЕ У ДВУХ ВИДОВ РОДА ALOPECURUS L.**

Закономерности процесса оплодотворения у злаков выявлены, в основном, на культурных видах выровненных ценопопуляций (Morrison, 1955, 1955; Оксьюк, Худяк, 1955; Герасимова-Навашина, Батыгина, 1959; Устинова, 1960; Bonnett, 1961; Бейліс-Вирова, 1962; Коробова, 1962; Cass, Jensen, 1970; Хведынич, Банникова, 1970; Чеботарь, 1972; Батыгина, 1974). Многолетние дикие и слабо окультуренные злаки представляют особый интерес для изучения эмбриологических процессов в связи с их многолетностью и гетерогенностью ценопопуляций.

Два вида рода *Alopecurus* L., *A. pratensis* L., *A. ventricosus* Pers., с четко выраженной протерогинией и сравнительно одинаковой экологией опыления, перспективные для возделывания на лугах, явились объектом изучения процесса оплодотворения.

Растения выращивались в коллекционном питомнике ботанического сада Уральского университета. Изолированные султаны (в числе 10—12) искусственно опыляли, когда рыльцевая фаза охватывала все соцветие. Через 10—15 мин. после опыления в течение часа через 5-минутные интервалы препарировали по 15 колосков из верхней, средней и нижней частей каждого соцветия, затем пробы отбирали через 2, 3, 5, 10, 18, 24 час. и фиксировали в смеси Чемберлена (Паушева, 1970), в которой оставляли до проводки по спиртам и заключения в парафин. Приготовление постоянных препаратов проводилось по общепринятой цитологической методике при толщине срезов 10 мк (Паушева, 1970). Для окраски препаратов использовали реактив Шиффа (по Фельгену) с модифицированной подкраской гематоксилином по Майеру и 1%-ным водным голубым.

Сформированный зародышевый мешок изучаемых видов лисохвоста имеет одинаковую топографию в анакампилотропной семязпочке: расположен вдоль продольной оси ее непосредственно под эпидермисом нуцеллуса в микропилярной части, примыкая вентральной стороной антиподального полюса к халазе. Постоянными структурами сформированного зародышевого мешка лисохвоста

лугового и вздутого являются яйцевой аппарат, представленный яйцеклеткой и двумя синергидами, центральная клетка с двумя неслившимися полярными ядрами и антиподальный комплекс. Синергиды продолговато-грушевидной формы с вогнутыми внутренними и выпуклыми внешними боковыми сторонами в виде колпачка замыкают микропиллярную часть зародышевого мешка. Ядра их расположены в базальной части в области зубцевидных выростов у внешних боковых стенок клеток, Фельген-отрицательны, продолговато-уплощены, с небольшими ядрышками. У лисохвоста вздутого иногда встречалось центральное положение ядер синергид, которое наблюдалось многими исследователями у других видов растений (Поддубная-Арнольди, 1964; Jensen, 1965; Чеботарь, 1972; Батыгина, 1974). Апикальная часть синергид несколько расширена, с крупноячейстой протоплазмой и небольшой вакуолью. В двух случаях из 25 изученных зародышевых мешков лисохвоста лугового одна из синергид по размерам, расположению ядра и вакуоли была сходна с яйцеклеткой. Синергиды, резко отличающиеся между собой по величине, форме и функциям, обнаружены у ряда видов *Allium* (Стожарова, Поддубная-Арнольди, 1975). При длительной подкраске гематоксилином по Майеру в микропиллярной части синергид выявляется нитчатый аппарат, которому многие авторы (Магешвари, 1954; Поддубная-Арнольди, 1964) отводят хемотропную роль в направленном движении пыльцевой трубки. Морфологической поляризации синергид соответствует полярное расположение клеточных органелл: пластид и митохондрий (Diboll, Larson, 1966; Чеботарь, 1972).

Яйцеклетка имеет более округлую, чем синергиды, форму и может быть расположена на вентральной, на любой из латеральных, но более часто на дорзальной стороне зародышевого мешка, несколько вдаваясь апикальной частью в центральную клетку. Ядро яйцеклетки находится в центре апикальной части ее, несколько крупнее ядер синергид, с равным или более крупным, чем у синергид, ядрышком. Не окрашиваясь реактивом Шиффа (по Фельгену), оно выглядит пустым, нечетко очерченным. После подкраски гематоксилином появляется некоторая структурированность ядра и более четкие очертания его. Базальная и периферийные части яйцеклетки содержат небольшие многочисленные вакуоли. У лисохвоста вздутого вакуолизированность базальной части яйцеклетки более сильно выражена, чем у лисохвоста лугового, иногда формируется одна большая вакуоль. Изучение ультраструктуры яйцеклетки показало, что цитоплазма ее исключительно «уплотнена» огромным количеством органелл (Jensen, 1965; Diboll, 1968; Чеботарь, 1972).

Центральная клетка зародышевого мешка занимает большую часть его, доходя в микрополярном районе до зубцевидных выростов синергид и полукольцом охватывая антиподальный комплекс в халазальной части. Местоположение сближенных ядер центральной клетки сильно варьирует. Почти одинаково часто встре-

чается расположение ядер около яйцеклетки, вблизи антипод или в центре как у лисохвоста лугового, так и у лисохвоста вздутного. Для злаков считается наиболее типичным смещение ядер центральной клетки в микропилярную часть ее, т. е. ближе к яйцеклетке (Поддубная-Арнольди, 1964; Коробова, 1962; Чеботарь, 1972; Батыгина, 1974). Цитоплазма центральной клетки сильно вакуолизована и в виде протоплазменных тяжей тянется по периферии клетки от микропилярного конца к антиподам, пронизывая более толстыми тяжами центр клетки. Основная ее часть собрана вокруг полярных ядер. Полярные ядра более часто, близко и плотно примыкают друг к другу (иногда сильно вдавливаясь одно в другое), но не сливаются до оплодотворения, всегда Фельген-отрицательны, с крупными почти одинаковыми ядрышками. У кукурузы отмечается (Чеботарь, 1972) некоторая ассоциация полярных ядер перед оплодотворением. По своей ультраструктуре (Diboll, Larson, 1966; Diboll, 1968; Чеботарь, 1972) организация центральной клетки свидетельствует об узкой ее специализации, связанной с трофическими функциями, которые проявляются очень рано. Это раннее проявление заметно по многочисленным деструктивным клеткам нуцеллуса, окружающим центральную клетку; особенно их много на дорзальной стороне зародышевого мешка, по направлению к которой разрастается последний. На противоположном конце от микропиле вдоль продольной оси зародышевого мешка первоначально обособляются 3 клетки-антиподы.

В процессе дифференциации клеток женского гаметофита антиподы претерпевают значительные морфологические изменения и сильно отличаются от остальных клеток зародышевого мешка. Они крупные, шарообразной формы, с некоторым гаусториальным вытягиванием к вентральной стенке зародышевого мешка, занимают значительную часть последнего. Цитоплазма клеток-антипод сильно вакуолизована, особенно по периферии клеток, интенсивно окрашена гематоксилином. Ядра антипод неправильной формы, варьируют в количестве от 1 до 4 и достигают больших размеров, Фельген-положительны. Деление ядер антипод начинается с образования более или менее правильной метафазной фигуры митоза, четкость, следующих фаз деления стирается, и к моменту обособления хроматинового вещества получают ядра неравной величины и неправильной формы, иногда сближенные и сливающиеся. Кроме увеличения количества ядер антипод, в них происходит политенизация хромосом, вследствие этого ядра антипод становятся рыхлыми. Другая особенность ядер антипод — наличие 2—4 и более вакуолизованных ядрышек, имеющих лопастную форму. Такая лабильность морфологии и числа ядрышек свидетельствует об усиленном метаболизме ядер антипод. О роли антипод в системе клеток женского гаметофита существуют противоречивые мнения. Многие считают, что антиподы участвуют в обеспечении питательными веществами клеток зароды-

шевого мешка (Магешвари, 1954; Поддубная-Арнольди, 1964 и др.). Другие утверждают, что антиподы потенциально равноценны яйцеклетке (Герасимова-Навашина, Батыгина, 1959; Модилевский, 1953; Яковлев, Солнцева, 1965). По ультраструктуре клетки-антиподы напоминают более меристематические клетки, чем гаметофитные, они мало специализированы (Чеботарь, 1972). Последнее положение, вероятно, связано с тем, что клетки-антиподы у кукурузы сохраняют длительное время митотическую активность, увеличиваясь в количестве до 40 и более (Чеботарь, 1972).

Антиподальный комплекс у изученных нами видов лисохвоста имеет видовые особенности. У лисохвоста лугового количество клеток-антипод равно 3, редко достигает 4—5, с одним крупным реституционным ядром, иногда с 2—3, оближенными или соединенными хроматиновыми тяжами (гантелевидные ядра). Лисохвост вздутый имеет обычное количество клеток-антипод 5—7, с многочисленными ядрами (до 7), первоначально обособленными (иногда гантелевидными) и только в процессе политенизации разрыхляющимися и сливающимися в общую лопастновидную хроматиновую массу, интенсивно окрашенную по Фельгену.

Содержимое пыльцевой трубки обнаруживалось в зародышевом мешке через 15—20 мин. после искусственного нанесения пыльцы на рыльца цветков. Пыльцевая трубка обычно входила в разрушенную синергиду, очень редко между синергидой и дорзальной стенкой зародышевого мешка или между синергидами, попадая в этом случае непосредственно в цель между яйцеклеткой и центральной клеткой. Описанные пути прохождения пыльцевой трубки в зародышевом мешке наблюдались многими авторами (Магешвари, 1954; Diboll, 1969; Поддубная-Арнольди, 1964; Cass, Jensen, 1970; Чеботарь, 1972).

Многочисленными эмбриологическими исследованиями показано, что одна из синергид начинает разрушаться к моменту достижения пыльцевой трубкой зародышевого мешка (Brink, Cooper, 1940; Jensen, Fisher, 1967; Cass, Jensen, 1970; Чеботарь, 1972 и др.). Дженсен и Фишер (Jensen, Fisher, 1967) предполагают, что дегенерация синергиды до вхождения пыльцевой трубки в зародышевый мешок, не являясь следствием механической интрузии пыльцевой трубки в синергиду, отражает физиологические изменения, вероятно, вызванные опылением. А. А. Чеботарь (1972) считает, что, возможно, пыльцевая трубка врастает в синергиду, начавшую дегенерировать, при незначительно задержанном типе оплодотворения. Искусственное задерживание опыления изолированных султанов до появления рыльцевой фазы в нижней части соцветия предопределило наличие задержанного типа оплодотворения в цветках из верхней части султана. Вероятно, поэтому в изучаемом материале часто встречались зародышевые мешки с картинками оплодотворения яйцеклетки и центральной клетки и с одной разрушенной синергидой! Пыльцевая трубка во всех

трех наблюдаемых случаях изливает свое содержимое в щель между яйцеклеткой и центральной клеткой. Сперва происходит внедрение одного из спермиев в цитоплазму яйцеклетки, другого — в цитоплазму центральной клетки или одновременно. В цитоплазме женских клеток вокруг спермия образуется неокрашенное пространство в виде ореола. Спермии при прохождении через цитоплазму имеют червеобразную форму. Достижение спермиями женских ядер происходит также неодновременно, к полярным ядрам спермий подходит позже. В зависимости от местоположения полярных ядер в центральной клетке меняется продолжительность времени, в течение которого второй спермий достигает одного или обоих полярных ядер. В литературе появились сведения о том, что передний спермий оплодотворяет яйцеклетку, задний — центральную клетку, перемещение спермиев к ядрам происходит с токами цитоплазмы в клетках (Беляева, 1975). По мере деспирализации спермиев в женских половых ядрах локально усиливается структурированность их, выявляемая реакцией Фельгена. После полного растворения хроматина спермия и выделения его ядрышка в женских половых ядрах последние снова становятся Фельген-негативными. На изменение хроматизации ядер яйцеклетки и центральной клетки в процессе оплодотворения указывают многие авторы (Хведынич, Банникова, 1970 и др.).

Промежуток времени, в течение которого хроматин спермиев деспирализуется в женских половых ядрах зародышевого мешка лисохвоста лугового и вздутого, находится между 45 мин. и 3 час. от момента опыления. У лисохвоста вздутого продолжительность деспирализации спермиев варьирует в максимальных пределах, наоборот, у лисохвоста лугового — в минимальных. Продолжительность растворения спермия в полярных ядрах центральной клетки у других видов злаков варьирует в этих же пределах, полное растворение спермия в ядре яйцеклетки наступает только через 15—18 час. (Оксиук, Худяк, 1955; Бейліс-Вирова, 1962; Абрамова, 1964; Хведынич, Банникова, 1970; Батыгина, 1974).

В полярных ядрах спермий растворяется быстрее, чем в ядре яйцеклетки, однако слияние полярных ядер после выделения ядрышка спермия несколько задерживается. Иногда, особенно часто в зародышевых мешках лисохвоста вздутого, спермий растворяется в одном из полярных ядер без слияния последнего с другим полярным ядром. К сожалению, дальнейшее поведение полярных ядер при эндоспермогенезе не прослежено. Размеры выделившихся ядрышек спермиев в женских половых ядрах не одинаковы, в ядре яйцеклетки они могут быть немного больше или меньше собственного ядрышка, в полярных ядрах — почти всегда больше, у лисохвоста вздутого часто сливаются с ядрышком одного из полярных ядер.

К отклонениям в ходе оплодотворения можно отнести растворение спермия в полярных ядрах на 1—2 сутки после оплодотворения или отсутствие оплодотворения, слияние обоих спермиев

или с ядром яйцеклетки, или с полярными ядрами, оплодотворенные синергиды. При оплодотворении полярных ядер двумя спермиями и синергиды яйцеклетка или отсутствовала, или находилась в стадии дегенерации. Нарушение полярности яйцеклетки, наблюдаемое у лисохвоста лугового, выражающееся в том, что вакуоль образуется на апикальном конце яйцеклетки, вероятно, может изменить движение спермиев, а при возможном оплодотворении — привести к неправильной ориентации апикальной области проэмбрио, что мы наблюдали при формировании зародыша лисохвоста лугового (Зуева, Иванова, Пискарь, 1975). З. В. Абрамова (1964) связывает случаи одинарного оплодотворения с условиями пониженных температур. Влияние внешних условий, особенно температуры, на скорость эмбриональных процессов отмечают многие исследователи (Герасимова-Навашина, 1960; Перунова, 1972).

В год наблюдений цветение и оплодотворение лисохвоста лугового протекало при высокой температуре (ср.  $22^{\circ}\text{C}$ , макс.  $37^{\circ}\text{C}$ ) и низкой влажности воздуха (30%) и почвы (41%) (Метеорологический декадник, 1973), цветение и оплодотворение лисохвоста вздутого (Метеорологический декадник, 1974) — при еще более неблагоприятных условиях: влажность воздуха достигала 26%, температура —  $40^{\circ}$  (на уровне соцветий, собственные измерения). Высокая температура и низкая влажность воздуха способствуют выбрасыванию и раскрытию пыльников, но препятствуют полному выходу рылец из цветковых чешуй. В 1974 г. выставляемость рылец была настолько недостаточной, что трудно было определять протяженность рыльцевой фазы по длине соцветия. Количество пыльцы, попавшее на небольшую выставленную часть рыльца, вероятно, было недостаточным для избирательного прорастания пыльцевых зерен и обусловило замедленный темп и отклонения, имевшие место при оплодотворении у обоих изученных видов лисохвоста. Следует учесть, что оба вида лисохвоста — растения влаголюбивые, особенно лисохвост вздутый, произрастающий в естественных местообитаниях при постоянном увлажнении или затоплении.

При отсутствии оплодотворения, которое часто встречалось у лисохвоста вздутого, на 5—10 сутки после опыления антиподы начинали изменять структурированность ядер и цитоплазмы. Ядра их пикнотизировались, сильно окрашиваясь по Фельгену, цитоплазма гомогенно красилась гематоксилином, теряя вакуолизованность, антиподальный комплекс в целом уменьшался в размерах. Подобные картины дегенерации антипод описаны в литературе при искусственно задержанном опылении (Ивановская, Прокофьева, 1970).

**Выводы.** 1. Изучение структуры зародышевых мешков двух видов лисохвоста (*Alopecurus pratensis* L., *A. ventricosus* Pars.) показало, что при типичном для злаков наличии в зародышевом мешке у обоих видов яйцевого аппарата из 2 синергид и яйцеклетки, центральной клетки с 2 неслившимися полярными

ядрами и антиподальным комплексом имеются видовые различия. У лисохвоста лугового количество антипод равно 3, каждая с одним реституционным ядром, у лисохвоста вздутого — 5—7 клеток-антипод с многочисленными ядрами разной величины и формы.

2. Пыльцевая трубка проникает в зародышевый мешок у обоих изученных видов через 15—20 мин. после опыления одним из трех способов: через дегенерирующую синергиду (наиболее обычный путь прохождения), между синергидой и дорзальной стенкой зародышевого мешка и между синергидами.

3. У изученных видов лисохвоста внедрение одного из спермиев в цитоплазму и ядро яйцеклетки проходит быстрее в сравнении со вторым спермием, проникающим в цитоплазму и полярные ядра центральной клетки. Растворение спермия в полярных ядрах протекает более ускоренно, чем в ядре яйцеклетки, но в обоих ядрах спермии растворяются в промежутке времени от 45 мин. до 3 час. от опыления. У лисохвоста вздутого промежуток времени, в течение которого спермии растворяются в женских ядрах, сдвинут в максимум.

4. Погодные условия оказывают влияние на процесс оплодотворения, увеличивая продолжительность его и, вероятно, предопределяя одинарное оплодотворение, наблюдаемое у лисохвоста лугового, и отсутствие оплодотворения — у лисохвоста вздутого.

#### ЛИТЕРАТУРА

Абрамова З. В., 1964. Цветение, оплодотворение и формирование зерновки пшеницы в зависимости от сорта и условий произрастания. Автореф. докт. дис. Л.

Батыгина Т. Б., 1974. Эмбриология пшениц. Л.

Бейліс-Вирова Р. А., 1962. Історія індивідуального розвитку жита. Київ.

Беляева Н. С., 1975. Поведение спермиев в зародышевом мешке покрытосеменных при двойном оплодотворении.— «Тезисы докладов XII Международного ботанического конгресса», 1, 244.

Герасимова-Навашина Е. Н., 1960. Влияние температурных условий на ход эмбриологических процессов у растений.— «ДАН», 131, № 3, 688—691.

Герасимова-Навашина Е. Н., Батыгина Т. Б., 1959. О ходе слияния половых ядер при оплодотворении у злаков.— «ДАН», 124, № 1, 223—226.

Ивановская Е. В., Прокофьева З. Д., 1970. Природа псевдофрагментации ядер с политенными хромосомами.— «Цитология и генетика», 4, № 5, 391—396.

Зуева Г. В., Иванова В. Г., Пискарь Е. А., 1975. Оплодотворение и развитие зародыша лисохвоста лугового.— «Тезисы докладов XII Международного ботанического конгресса», 1, 250.

Коробова С. Н., 1962. К эмбриологии кукурузы.— «Тр. БИН АН СССР», сер. 7, вып. 5, 294—314.

Магешвари П., 1954. Эмбриология покрытосеменных. М.

Метеорологический декадник, 1973. Свердловск.

Метеорологический декадник, 1974. Свердловск.

Модилевский Я. С., 1953. Эмбриология покрытосеменных растений. Киев.

Оксиюк П. Ф., Худяк М. И., 1955. Новые данные об оплодотворении у пшеницы.— «ДАН», 105, № 4, 835—838.

Паушева З. П., 1970. Практикум по цитологии растений. М.

Перунова Т. В., 1972. О скорости роста пыльцевых трубок ячменя.— «Тр. по прикл. бот., генетике и селекции», 47, № 2, 113—115.

Поддубная-Арнольди В. А., 1964. Общая эмбриология покрытосеменных растений. М.

Стожарова И. А., Поддубная-Арнольди В. А., 1975. Роль синегрида при оплодотворении и эмбриогенезе у *Allium*.— «Тезисы докладов XII Международного ботанического конгресса», 1, 264.

Устинова Е. И., 1960. Цитозембриологическое исследование зародышевого мешка и процесса оплодотворения у кукурузы.— «Ж. общ. биологии», 21, № 4.

Хведыныч О. А., Банникова В. П., 1970. Изменение хроматизации женских и мужских половых ядер в процессе оплодотворения у ячменя.— «Цитология и генетика», 4, № 5, 387—391.

Чеботарь А. А., 1972. Эмбриология кукурузы. Кишинев.

Яковлев М. С., Солнцева М. П., 1965. Некоторые вопросы морфологии цветка и эмбриология ковылей.— В кн.: Морфология цветка и репродуктивный процесс у покрытосеменных растений, 61—73. М.— Л.

Bonnett O. T., 1961. The oat plant: its histology and development. Urbana.

Brink R. A., Cooper, 1940. Double fertilization and development of the seed in angiosperms.— «Bot. Gaz.», 102, N 1, 1—25.

Cass D. D., Jensen W. A., 1970. Fertilization in barley.— «Amer. J. Bot.», 57, N 1, 62—70.

Diboll A. G., 1968. Fine structural development of the megagametophyte of *Zea mays* following fertilization.— «Amer. J. Bot.», 85, N 7, 797—806.

Diboll A. G., Larson D. A., 1966. An elektron microscopic study of the nature megagametophyte in *Zea mays*.— «Amer. J. Bot.», 53, N 4, 391—402.

Morrison J. W., 1955. Fertilization and postfertilization development in wheat.— «Canad. J. Bot.», 33, N 2, 168, 176.

Jensen W. A., 1965. The Ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton.— «Amer. J. Bot.», 52, N 3, 238—256.

Jensen W. A., Fisher D. B., 1967. Observations on the pollen tube and its entrance into the embryo sac in cotton.— «Amer. J. Bot.», 54, N 6, 636.