

ФОРМИРОВАНИЕ ЖЕНСКИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ СТРУКТУР У *EPHEDRA ARBOREA* LAG. И *EPHEDRA DISTACHYA* L. (EPHEDRACEAE) В КРЫМУ

РУГУЗОВА А.И., кандидат биологических наук

Введение

Во флоре Крыма описаны два местных вида рода *Ephedra* – *Ephedra distachya* L. и *Ephedra arborea* Lag. *E. distachya* произрастает вдоль крымского побережья Черного моря, в прибрежной зоне, испытывающей повышенную антропогенную нагрузку. Под действием антропогенного фактора численность данного вида в Крыму неуклонно сокращается.

E. arborea – аборигенный вид Крыма с очень ограниченным ареалом [6]. В Крыму он описан в окрестностях города Судак, поселка Новый Свет и на восточном склоне горы Аю-Даг, в бухте Панаир. Ботаники считают, что *E. arborea* находится под угрозой исчезновения в Крыму, и рекомендуют включить данный вид в Красную Книгу Крыма [1, 2]. В связи с этим актуальным является вопрос о возможности семенного возобновления местных видов рода *Ephedra* в Крыму, что в свою очередь предполагает изучение репродуктивных структур данных видов, процессов опыления, оплодотворения, эмбриогенеза и формирования полноценных семян.

Целью данной работы было: выявить особенности формирования женских репродуктивных структур у *E. arborea* и *E. distachya* в условиях их естественного произрастания.

Объекты и методы исследований

Исследования проводили на женских особях в естественных популяциях *E. arborea* и *E. distachya*. Популяция *E. arborea* находится на восточном склоне горы Аю-Даг, в бухте Панаир и насчитывает 26 растений: 11 женских и 15 мужских особей. Высота растений 30 – 60 см, диаметр куста 40 – 126 см.

Популяция *E. distachya* расположена на южных склонах Партенитской бухты. Женские экземпляры представлены небольшими кустами до 20 см высотой.

Фенологические наблюдения и сбор материала для эмбриологических исследований проводили от закладки мегастробилов до опыления через каждые 3 суток. Собранные образцы изучали под биноклем, измеряли и фиксировали по Карнуа (6:3:1). Фиксированный материал хранили в 70% этиловом спирте. Постоянные препараты готовили по общепринятой в цитозембриологии методике [5]. Для приготовления серий срезов использовали ротационный микротом. Толщина срезов 10 мкм. Препараты окрашивали метилгрюнпиронином по

Унна с подкраской алциановым синим [4, 7]. Время окраски отработывалось для каждой стадии развития и варьировало от 24 до 48 часов. Анализ препаратов проводили на микроскопе Jenaval. Рисунки выполняли с помощью рисовального аппарата РА-4.

Результаты и обсуждение

Женские репродуктивные органы у обоих видов дифференцируются ранней весной. Они представлены собраниями мегастробилов, расположенными на побегах, длиной 3 - 38мм. В одном узле у *E. arborea*

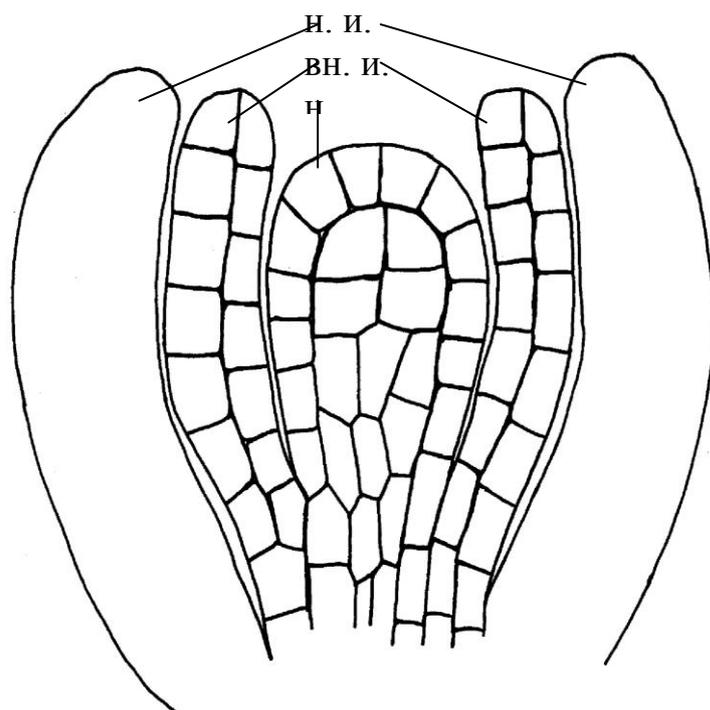


Рис. 1. Начальные этапы формирования семязачатка *E. arborea* (вн.и. – внутренний интегумент, н. – нуцеллус семязачатка, н.и. – наружный интегумент)

наружный интегументы (рис. 1).

Вопрос о происхождении и названии «наружный интегумент» у видов *Ephedra* является дискуссионным. Часто его называют «покровом» или «околоцветником» [15, 10, 3]. Некоторые исследователи считают, что наружный интегумент сформировался в результате срастания двух листьев «околоцветника». Согласно нашим исследованиям, наружный слой интегумента представлен клетками эпидермиса с утолщенными оболочками, с внутренней стороны (обращенной к нуцеллусу семязачатка) под эпидермой расположен хорошо развитый слой гиподермальной склеренхимы, которая также встречается в листьях некоторых голосеменных растений [9]. На ранних стадиях развития семязачатков эти

может быть от 1 до 5 таких побегов, у *E. distachya* на одном узле, как правило расположены 1-3 побега с собраниями мегастробилов, редко - 5. Собрание мегастробилов у обоих видов состоит из четырех пар стерильных чешуевидных зеленых листьев и двух мегастробилов. Каждый мегастробил содержит один семязачаток, который закладывается в пазухе кроющей чешуи и состоит из нуцеллуса, окруженного наружным и внутренним интегументами. В пазухе чешуи сначала появляется бугорок нуцеллуса, латерально начинают развиваться внутренний и

склеренхимные клетки имеют слегка утолщенные оболочки и живое содержимое (ядро, цитоплазму), однако, к моменту опыления их оболочки начинают утолщаться, а содержимое дегенерирует. В это время между клетками формируются хорошо заметные межклетники. В ткань наружного интегумента входят проводящие пучки. Наши наблюдения показали, что у *E. distachya* в наружный интегумент входят три проводящих пучка, однако, один из них поднимается только до середины семязачатка, тогда как два других заканчиваются в верхней части наружного интегумента. В то же время в наружный интегумент *E. arborea* входят только два проводящих пучка и оба поднимаются до его верхней части. В литературе имеются данные, что у *E. gerardiana* в наружный интегумент входят три проводящих пучка [19]. В проводящих пучках ксилема обращена к адаксиальной стороне, а флоэма – к абаксиальной. Проводящие пучки окружены трансфузионной тканью, состоящей из живых паренхимных клеток с неодревесневшими оболочками и тонкостенных, но имеющих одревесневшие оболочки, трахеид с окаймленными порами. Трансфузионная ткань встречается в листьях голосеменных растений, но обнаруживает различное пространственное расположение по отношению к проводящим пучкам [11, 12]. Таким образом, анатомическое строение наружного интегумента имеет много общего с листьями голосеменных растений. Результаты наших исследований подтверждают мнение ряда ученых [10, 3] о том, что наружный интегумент формируется в результате срастания двух листьев. Что касается термина, то мы считаем правомерным использование термина «наружный интегумент», который отвечает сути и функциям данной структуры.

Внутренний интегумент состоит из двух рядов прямоугольных клеток с интенсивно окрашенным ядром с ядрышком и светлой цитоплазмой. Клетки внутреннего интегумента периклинально делятся, и он очень быстро начинает возвышаться над нуцеллусом и наружным интегументом, который состоит из 5-6 рядов прямоугольных клеток. Клетки наружного интегумента тоже делятся периклинально. В процессе развития женского гаметофита оба интегумента быстро растут. К моменту опыления внутренний интегумент формирует микропиллярный канал, который возвышается над чешуями, окружающими семязачаток, на 1,5 мм и заканчивается воронковидным микропиле. В этот период содержимое клеток, формирующих микропиллярный канал, дегенерирует, стенки клеток наружного слоя остаются тонкими, а радиальные и внутренние стенки клеток внутреннего слоя значительно утолщаются.

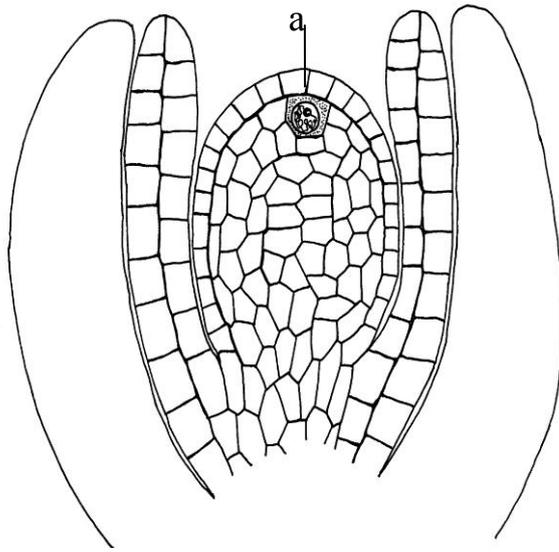


Рис. 2. Дифференция археспориальной клетки *E. arborea* (а – археспориальная клетка)

инициаль делится и дает начало спорогенной и париетальной клеткам. Последняя многократно делится, формируя париетальную ткань, и оттесняя спорогенную клетку вглубь нуцеллуса. Р.Н. Mehra [15] считает, что у *E. intermedia* археспориальная клетка не делится, а дифференцируется в материнскую клетку мегаспор. Хотя у *E. foliata* [14], *E. americana* var. *andina* [17], *E. gerardiana* [19] наблюдали деление археспориальной клетки и формирование спорогенной ткани. У *E. arborea* и *E. distachya*, как и у некоторых других видов рода *Ephedra* [13] спорогенная ткань не образуется, а спорогенная клетка дифференцируется в материнскую клетку мегаспор. Эта клетка содержит хорошо окрашенное ядро с крупным ядрышком, окруженное плотной цитоплазмой. Перед делением мегаспороцита в халазальной части клетки формируется крупная вакуоль и оттесняет ядро к клеточной стенке (рис.3).

Мегаспороцит мейотически делится, формируя линейную тетраду мегаспор. Три верхние

На ранних стадиях развития нуцеллус у обоих видов развивается благодаря делению субэпидермальных клеток нуцеллуса, тогда как у некоторых видов *Ephedra* нуцеллус формируют периклинально делящиеся эпидермальные клетки [18]. Когда нуцеллус состоит из нескольких десятков клеток, в субэпидермальном слое дифференцируется археспориальная инициаль. Это крупная клетка, с плотной цитоплазмой и большим интенсивно окрашенным ядром (рис. 2). Археспориальная

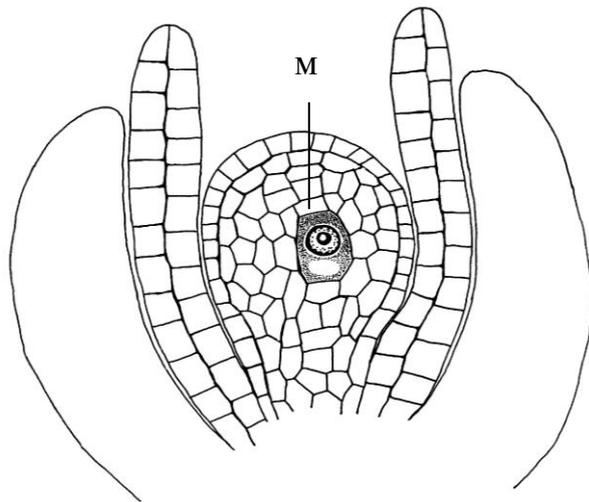


Рис. 3. Клетка мегаспороцита перед делением у *E. arborea* (м – мегаспороцит)

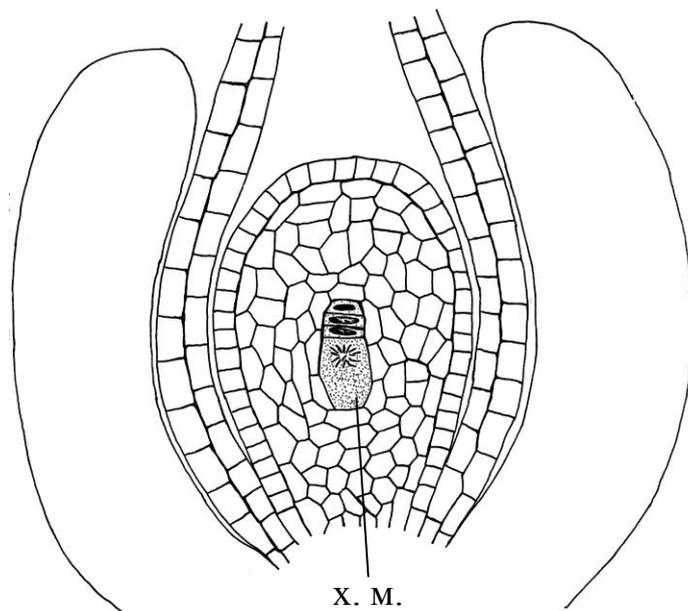


Рис. 4. Тетрада мегаспор у *E. arborea*
(х. м. – халазальная мегаспора)

свободнаядерного женского гаметофита различно у разных видов рода *Ephedra*.

клетки тетрады очень быстро дезинтегрируют, а халазальная мегаспора увеличивается в размерах (рис. 4) и дает начало свободнаядерному женскому гаметофиту, поскольку деление ядер не сопровождается цитокинезом (рис. 5 А, Б). Ядра женского гаметофита со светлой кариоплазмой и несколькими ядрышками расположены по периферии полости женского гаметофита и окружены плотной цитоплазмой, в центре формируется крупная вакуоль.

Количество кариокинезов при формировании

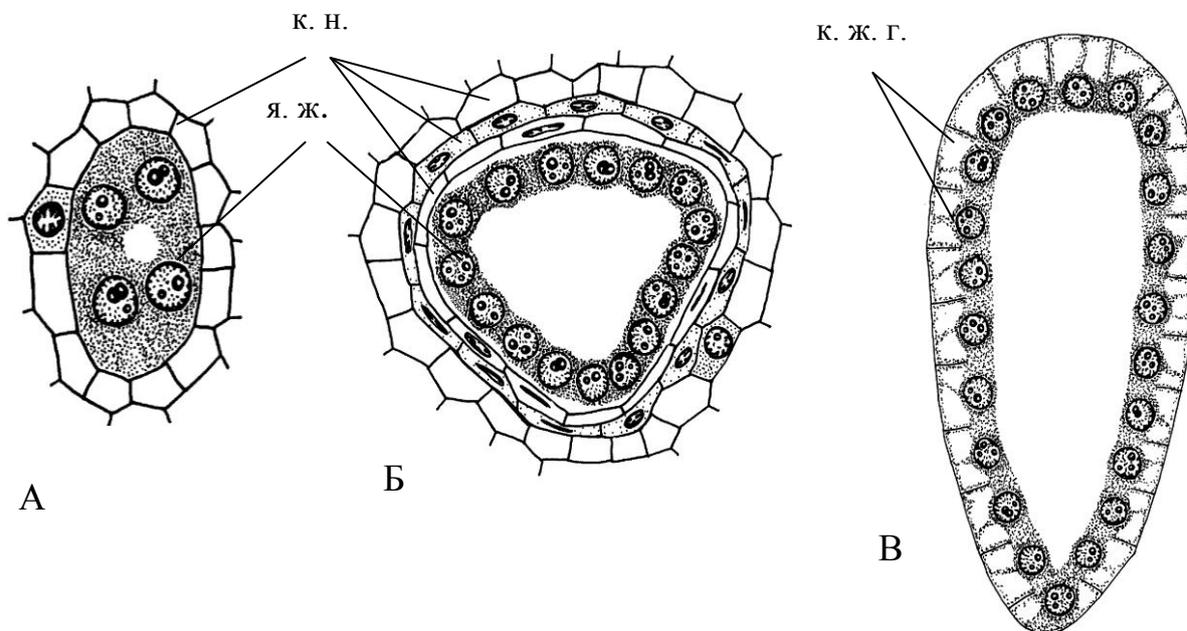


Рис. 5. Развитие женского гаметофита у *E. arborea*: А- четырехядерный женский гаметофит (продольный срез), Б – 16-ти ядерный женский гаметофит (поперечный срез), В – начало формирования клеточного гаметофита (продольный срез) (к.н. – клетки нуцеллуса, к.ж.г. – клетки женского гаметофита, я.ж. – ядра женского гаметофита).

Р.Н. Mehra [15] в работе, посвященной изучению женского гаметофита *E. intermedia*, отмечал, что до стадии 64 ядерного женского гаметофита деления происходят синхронно, но при дальнейшем развитии синхронность нарушается, а на последней стадии развития свободоядерного гаметофита одно или несколько ядер могут не делиться, что влияет на конечное количество ядер женского гаметофита. У *E. arborea* и *E. distachya* проходит 8 кариокинезов и формируется 256 ядер. После этого между ядрами начинают закладываться поперечные перегородки (рис. 5 В). Ядра, соединенные между собой тяжами цитоплазмы, расположены на внутренней стороне открытых клеток, удлиненных к центру гаметофита альвеол. В это время полость женского гаметофита имеет конусовидную форму, а сам гаметофит окружен

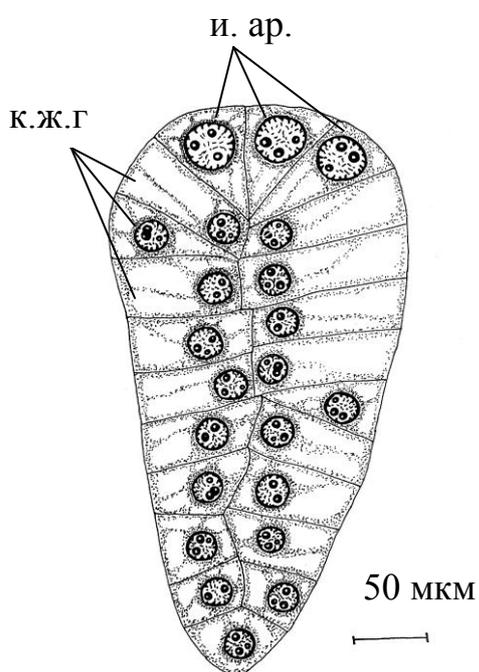


Рис. 6. Клеточный гаметофит *E. arborea*
(и. ар. – инициаль архегония, к. ж. г. – клетки женского гаметофита)

альвеол не делятся, их ядра увеличиваются, цитоплазма вокруг ядер уплотняется – дифференцируются архегониальные инициали (рис. 6). У *E. arborea* их, как правило, три, а у *E. distachya* – 2 - 4. Каждая архегониальная инициаль делится периклинально и дает начало центральной клетке архегония и инициали шейки архегония (рис. 7), которая впоследствии многократно делится и образует многоклеточную шейку архегония.

Центральная клетка быстро увеличивается в размерах, в цитоплазме видны крупные вакуоли, ядро большое с одним или несколькими

мегаспориальной мембраной, которая описана у *E. distachya* на ультраструктурном уровне [16]. Поскольку в халазальном конце полость женского гаметофита намного уже, чем в микропилярном, альвеолы здесь очень быстро встречаются и образуют небольшие клетки. В микропилярной части женского гаметофита альвеолы длинные, со светлой цитоплазмой и интенсивно окрашенным ядром. Некоторые альвеолы не достигают центра, а образуют небольшие треугольные клетки (рис. 6). Как только альвеолы встречаются в центре полости женского гаметофита, они сразу же начинают делиться, при этом закладываются поперечные перегородки.

В микропилярной части женского гаметофита несколько

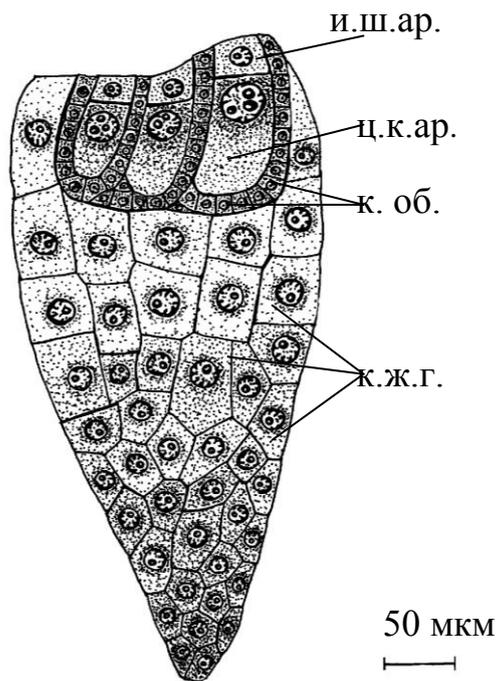


Рис. 7. Формирование архегониев у *E. arborea* (и. ш. ар. – инициаль шейки архегония, к. об. – клетки обкладки, к. ж. г. – клетки женского гаметофита, ц. к. ар. – центральная клетка архегония)

ядрышками, кариоплазма светлая. Вокруг каждого архегония дифференцируются два ряда клеток обкладки. Это небольшие клетки с очень плотной цитоплазмой и ядром с несколькими ядрышками (рис. 7). На ранней стадии развития клетки обкладки одноядерные, позже они становятся двуядерными и многоядерными. Женский гаметофит быстро растет за счет активных митозов в его халазальной части и продвигается вглубь семязачатка, почти достигая гипостазы. Как и у большинства видов рода *Ephedra* [18], у *E. arborea* и *E. distachya* гипостаза хорошо развита. На поздних стадиях развития она имеет подковообразную форму и состоит из нескольких рядов клеток, содержимое которых полностью лизировало. Основная функция гипостазы у видов рода *Ephedra*, очевидно, трофическая. Поскольку

у большинства голосеменных растений гипостаза не формируется, то ее функции очень мало обсуждаются в литературе по эмбриологии голосеменных, значительно лучше эти вопросы освещены в работах по эмбриологии покрытосеменных растений [8]. Считается, что гипостаза – многофункциональная структура: секретирует ферменты и регуляторы роста, поддерживает водный обмен, выполняет механические, защитные и гаусториальные функции, но основная ее функция трофическая. Специализированные клетки гипостазы осуществляют транспорт метаболитов к спорогенным и гаметофитным структурам.

Во время развития архегония и интенсивного роста женского гаметофита клетки нуцеллуса, расположенные над архегониями, начинают дезинтегрировать и лизируют. Этот процесс начинается с верхушки нуцеллуса и заканчивается у женского гаметофита – образуется глубокая пыльцевая камера конусовидной формы, нижний край которой достигает архегониев. Ко времени опыления женский гаметофит хорошо развит, дифференцирован на три зоны: верхнюю фертильную, состоящую из больших клеток со светлой цитоплазмой, среднюю запасующую и нижнюю гаусториальную. Архегонии содержат многоклеточную шейку,

состоящую из небольших клеток, и крупную центральную клетку. Пыльцевая камера достигает архегониев. Микропилярная трубка возвышается над наружным интегументом.

Процессы развития женских репродуктивных структур *E. arborea* и *E. distachya* в условиях Крыма проходят без существенных отклонений вне зависимости от гидротермических условий в этот период и места произрастания. К моменту опыления количество нормально развитых семязачатков у обоих видов составляет 95-100%.

Выводы

1. В условиях Крыма нарушения в процессе формирования женских репродуктивных структур у видов *E. arborea* и *E. distachya* не являются лимитирующим фактором при формировании полноценных семян, поскольку к моменту опыления 95-100% семязачатков нормально развиты и готовы к приему пыльцы.

2. Существенных отличий при формировании репродуктивных структур *E. arborea* и *E. distachya* не выявлено. Собрание мегастробиллов у обоих видов состоит из четырех пар стерильных листьев и двух мегастробиллов. Каждый мегастробилл содержит один атропный, крассиуцелятный двупокровный семязачаток.

3. Археспориальная клетка у обоих видов дифференцируется в субэпидермальном слое нуцеллуса и дает начало париетальной и спорогенной клеткам. Последняя, не формируя спорогенную ткань, дифференцируется в мегаспороцит, который делится и формирует линейную тетраду мегаспор.

4. Женский гаметофит формирует халазальная мегаспора. В своем развитии он проходит свободноядерную, альвеолярную и клеточную стадии. Формирование альвеол начинается после 8 синхронных кариокинезов и образования 256 ядер женского гаметофита.

5. В микропилярной зоне клеточного гаметофита у *E. arborea* развивается три архегония, у *E. distachya* – от 2 до 4 архегониев. Халазальная зона гаметофита у обоих видов почти достигает гипостазы.

6. Ко времени опыления женский гаметофит хорошо развит, архегонии содержат шейку и крупную центральную клетку, над архегониями сформирована пыльцевая камера и микропилярная трубка возвышается над наружным интегументом.

Список литературы

1. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма (второе издание) / Никит. ботан. сад. – Ялта, 1996.– 125 с.
2. Голубев В.Н., Ена Ан.В., Сазонов А.В. Список видов биоты, рекомендуемых для включения в Красную Книгу Крыма. Высшие

сосудистые растения // Вопросы развития Крыма. Научно-практический дискуссионно-аналитический сборник. – 1999. – Вып. 13. – С. 35-47.

3. Жизнь растений: В 6 т. / М., 1978. – Т. 4: Папоротники и голосеменные растения. – 447 с.

4. Методические рекомендации по рациональному использованию крымского генофонда *Juniperus foetidissima* Willd / сост. Л.У. Склонная, И.А. Ругузов, В.П. Костина. Никит. ботан. сад – Ялта, 1992. – 41 с.

5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений – М.: Колос, 1980. – 304 с.

6. Флора Европейской части СССР: В 9 т. / Л., 1974. – Т.1. – С.195–204.

7. Шевченко С.В., Чеботарь А.А. Особенности эмбриологии маслины европейской (*Olea europaea*) // Труды Никит. ботан. сада – 1992. – Т.113. – С. 52–64.

8. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции: В 3 т. / Бот. ин-т им. В.Л. Комарова РАН. - СПб., 1994. – Т. 1: Генеративные органы цветка. – 508 с.

9. Эсау К. Анатомия растений / пер. с англ. А.Е. Васильева, М.Ф. Данилова, Н.В. Первухина, Н.С. Снигиревская / под ред. проф. Л.В. Кудряшова – М., 1969. – 564 с.

10. Eames A.J. Relationships of the Ephedrales // Phytomorphology. – 1952. - N 2. – P. 79–100.

11. Gathy P. Les fleuilles de Larix. Etude anatomique // Cellule. – 1954. – Vol. 56. – P. 331–353.

12. Lederer B. Vergleichende Untersuchungen uber das Transfusionsgewebe einiger rezenter Gymnospermen // Bot. Studien Heft. – 1955. – N 4. – P. 1–42.

13. Lehmann-Baelts M. Etude sur les Gnetales – XII. Ovule, gametophyte, femelle et embryogenese chez *Ephedra distachya* L. // Cellule. – 1967. – Vol. 67. – P.53–87.

14. Maheshwari P. Contributions to the morphology of *Ephedra foliata* Boiss. I The development of the male and female gametophytes // Proc. Indian Acad. Sci. – 1935. – Vol. 1. – P. 586–606.

15. Mehra P.N. Occurrence of hermaphrodite flowers and the development of female gametophyte in *Ephedra intermedia* Shrenk et May. // Ann. Bot. (London) N.S. – 1950. – Vol.14. – P. 165–180.

16. Moussel B., Moussel C. Evolution rythmique de l'appareil de golgi et du plasmalemme en liason avec la croissance de la paroi enveloppant le prothalle femelle cenocytique de *Ephedra distachya* L. // Caryologia. – 1973. – Vol. 25 (suppl.) – P. 97–108.

17. Pankov H. Histogenetische Studien an den Blüten einiger Phanerogamen // Bot. Studien. – 1962. – Vol. 13. – P. 1–106.

18. Singh H. Embryology of Gymnosperme. Encyclopedia of Plant Anatomy X (2) – Berlin, Stuttgart, 1978. – 304 p.

19. Singh H., Maheshwari K. A contribution to the embryology of *Ephedra gerardiana* Wall // Phytomorphology. – 1962. – Vol. 12, N 3. – P. 361–372.

Formation of female reproductive sphere in *Ephedra arborea* Lag. and *Ephedra distachya* L. (Ephedraceae) in the Crimea

Ruguzova A.I.

The description of female gametophyte formation in *E. arborea* has been given in this article. Some specific features of female gametophyte formation in Ephedraceae have been discussed.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Автономной Республики Крым