

Некоторые особенности системы репродукции *Paeonia anomala* L. (Paeoniaceae Raf.)

Some features of *Paeonia anomala* L. reproduction (Paeoniaceae Raf.)

Виноградова Г. Ю., Сапунова Е. А.

Vinogradova G. Yu., Sapunova E. A.

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: vinogradova-galina@binran.ru;
ESapunova@binran.ru

Komarov Botanical Institute of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Реферат. Представители рода *Paeonia* обладают рядом интересных особенностей репродукции, к числу которых относятся уникальный, не встречающийся у других покрытосеменных растений Paeoniad-тип эмбриогенеза, формирование в семязачатке множественного археспория и возможность развития нескольких гаметофитов. В настоящем исследовании проведен детальный анализ развития женских репродуктивных структур у *P. anomala* и выявлен ряд закономерностей, обуславливающих развитие нескольких зародышевых мешков в одном семязачатке. На ранних стадиях в семязачатке формируется множественный археспорий, дифференцирующийся в дальнейшем в спорогенный комплекс из 12–18 мегаспороцитов. К мегаспорогенезу способны 2–3 (реже 1) мегаспороцита, образующие перед мейозом каллозную оболочку. Развитие женского гаметофита происходит по моноспорическому Polygonum-типу. Анализ соотношения семязачатков с 1 или 2 развивающимися гаметофитами выявил частую гибель дополнительных тетрад мегаспор, а в некоторых случаях и всех тетрад в семязачатке. Второй критической стадией является стадия 4-ядерного зародышевого мешка, где также отмечен высокий процент дегенерирующих гаметофитов. Зрелый зародышевый мешок включает яйцевой аппарат из яйцеклетки и 2 синергид на микропиллярном полюсе, 3 антиподы – на халазальном, и центральную клетку с вторичным полярным ядром, расположенным в центре. Около половины исследованных семязачатков имели 2 зрелых зародышевых мешка. Выявлены некоторые особенности процесса оплодотворения при развитии 2 зародышевых мешков. В семязачаток может входить несколько пыльцевых трубок, которые приносят спермии для оплодотворения половых клеток обоих зародышевых мешков. Однако, в некоторых случаях отмечено вхождение одной пыльцевой трубки, спермии которой расходятся к яйцеклеткам разных зародышевых мешков, при этом полярные ядра не оплодотворяются и эндосперм не образуется, что может быть причиной остановки развития семени. Сделано предположение, что нарушения в развитии женского гаметофита и процессе оплодотворения, связанные с образованием нескольких зародышевых мешков, могут обуславливать снижение семенной продуктивности растений.

Ключевые слова. Зародышевый мешок, мегаспорогенез, оплодотворение, репродукция, *Paeonia*, Paeoniaceae.

Summary. Representatives of the genus *Paeonia* have a number of interesting reproductive features, including a unique Paeoniad-type of embryogenesis, not found in other angiosperms, as well as the formation of multiple archesporium in the ovule and the possibility of developing several gametophytes. In this study, a detailed analysis of the development of female reproductive structures in *P. anomala* was carried out and a number of regularities were revealed that determine the development of several embryo sacs in one ovule. At the early stages, multiple archesporium, formed in the ovule, differentiates into a sporogenous complex, including 12–18 megasporocytes. 2–3 (rarely 1) megasporocytes are capable of megasporogenesis after the formation of a callose wall on them before meiosis. Development of the female gametophyte occurs according to the monosporic Polygonum-type. An analysis of the ratio of ovules with the 1 or 2 developing gametophytes revealed frequent death of additional megaspore tetrads, and in some cases, of all tetrads in the ovule. The second critical stage is the stage of the 4-nucleate embryo sac, where a high percentage of degenerating gametophytes is also noted. The mature embryo sac includes the egg apparatus from the egg cell and 2 synergids at the micropylar pole, 3 antipodals at the chalazal pole, and the central cell with a secondary polar nucleus located in the center. About half of the ovules studied had 2 mature embryo sacs. Some features of the fertilization in the ovule with 2 embryo sacs were revealed. Several pollen tubes can enter the ovule, which bring sperm for fertilization of the sex cells of both embryo sacs. However, in some cases, the entry of one pollen tube has been noted, the sperm of which merge with the egg cells of different embryo sacs, while the polar nuclei are not fertilized and the endosperm is not formed. It may be the reason for

the cessation of seed development. It has been suggested that disturbances in the development of the female gametophyte and the process of its fertilization, possibly associated with the formation of several embryo sacs, may cause a decrease in the seed productivity of plants.

Key words. Embryo sac, fertilization, megasporogenesis, *Paeonia*, Paeoniaceae, reproduction.

Введение. Род *Paeonia* L. включает более 30 видов, произрастающих в ряде областей Сибири, южной Европы и на западе Северной Америки (Halda et al., 2004). Представители этого рода обладают высокими декоративными качествами и широко культивируются в садово-парковых хозяйствах и озеленении. Многие виды пионов характеризуются высоким содержанием органических кислот, эфирных масел, фенольных соединений, гликозидов, широко используемых в фармакологии и медицине (Реут, Миронова, 2013).

Основным способом размножения пионов является семенной, и нормальное протекание репродуктивных процессов – важный фактор для образования семян. Однако при культивировании некоторых видов и декоративных сортов, часто возникают сложности с семенной репродукцией, приводящие к наличию в плодах множества aberrantных семян, вероятно, образующихся в результате нарушений в развитии семязачатка и женского гаметофита (Шамров, 1997; Chen et al., 2022).

Как показали эмбриологические исследования, система репродукции пионов характеризуется рядом особенностей. Во-первых, это – уникальный, не встречающийся у других покрытосеменных растений, Paeoniad-тип эмбриогенеза, при котором первые деления зиготы происходят без цитокинеза, и лишь спустя несколько циклов свободно-ядерных делений формируется периферический клеточный слой с многочисленными меристематическими очагами, дающими начало зародышам (эмбриоидам), хотя преимущественное развитие получает лишь один (Яковлев, Иоффе, 1957, 1960; Carniel, 1967; Батыгина, 1997). Такие эмбриоиды широко используются в микроклональном размножении для поддержания ценных сортов и гибридов (Du et al., 2020). Второй важной особенностью репродукции пионов является формирование в семязачатке большого спорогенного комплекса, отдельные клетки которого могут вступать в мейоз и формировать гаметофиты (Walters, 1962; Яковлев, Иоффе, 1965; Шамров, 1997; Öztürk, Ünal, 2003). У некоторых видов, например, *P. californica* Nutt. (Walters, 1962) и *P. wittmanniana* Steven (Яковлев, Иоффе, 1965) до 3 зародышевых мешков могут развиваться до зрелого состояния. Однако такие случаи единичны, в большинстве случаев дополнительные зародышевые мешки дегенерируют в процессе своего развития и причины их дегенерации остаются не ясны. Также не известно, участвуют ли такие мешки в процессе оплодотворения и могут ли формировать зародыши.

В связи с этим, цель настоящей работы – на примере *Paeonia anomala* L. выявить некоторые особенности репродукции пионов с особым вниманием на закономерности образования дополнительных зародышевых мешков и их роли в процессе оплодотворения.

Материалы и методы. Бутоны и цветки были собраны с растений *P. anomala* из коллекции открытого грунта Ботанического сада им. Петра Великого Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) и зафиксированы в фиксаторе Навашина (1%-й водный раствор хромовых квасцов : 16%-й раствор формалина : ледяная уксусная кислота в соотношении 10 : 4 : 1 по объему) в течение 2 суток. Обработка материала и приготовление препаратов проводились по общепринятой цитоэмбриологической методике (Паушева, 1980). Окрашивали препараты гематоксилином по Эрлиху и алциановым синим, заключали срезы в поливиниловый спирт Mowiol (Fluka, Germany). Для выявления каллозы на стенках мегаспороцитов и растущих пыльцевых трубок применялась окраска анилиновым синим (0,1%-й раствор в 50%-м этаноле с добавлением 0,1 N раствора K_2HPO_4 в соотношении 3 : 1 по объему). Качество пыльцы оценивали методом окраски ацетокармином и методом проращивания пыльцы на жидкой среде – 5%-м растворе сахарозы с добавлением борной кислоты (Абрамова и др., 1981). Для визуализации проросших пыльцевых трубок окрашивали их анилиновым синим. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany) ЦКП БИН РАН; фотографии выполнены цифровой камерой AxioCam 807 (Carl Zeiss, Germany).

Результаты и обсуждение. Развитие семязачатка и зародышевого мешка у *P. anomala* происходит сходным образом с другими исследованными видами пионов (Яковлев, Иоффе, 1957, 1965; Шамров, 1997; Öztürk, Ünal, 2003), за исключением некоторых отличий в толщине интегументов, париетальной ткани, нуцеллярного колпачка. Сформированный семязачаток – крассинуцеллярный, битегмальный,

геми-кампилотропный, наружный интегумент массивный, 11–12-слойный; внутренний интегумент 3–4-слойный. Характерной чертой семязачатка *P. anomala*, как и других пионов, является формирование множественного археспория, клетки которого после нескольких делений дифференцируются, образуя спорогенный комплекс из 12–18 мегаспороцитов (рис. 1, 1). В период дифференциации мегаспороцитов значительно увеличивается нуцеллус в апикальной части, в результате над спорогенными клетками к началу мегаспорогенеза формируются 3–4-слойный нуцеллярный колпачок и 4–5-слойная париетальная ткань, а концу мегаспорогенеза париетальная ткань достигает 9 слоев. В мейоз обычно вступают 2–3 мегаспороцита (реже 1), окруженные каллозной оболочкой, что также было ранее отмечено для *P. caucasica* Schipcz. и *P. veitchii* Lynch (Vinogradova, Zhinkina, 2021). Развитие зародышевого мешка у *P. anomala* происходит в соответствии с моноспорическим Polygonum-типом. После мейоза формируются тетрады мегаспор, также окруженные каллозной оболочкой, при этом наиболее толстый ее слой на апикальном конце вокруг микропилярной мегаспоры, а на халазальном он практически отсутствует (рис. 1, 2, 3). Такое распределение каллозы некоторые авторы связывают с неполной изоляцией мегаспороцита во время мейоза и избирательным транспортом веществ (Rodkiewicz, Bednara, 2002).

Развивающийся из халазальной мегаспоры зародышевый мешок претерпевает 3 митоза, последний сопровождается клеткообразованием, образуется 7-клеточный, 8-ядерный гаметофит. В некоторых случаях в одном семязачатке развиваются два зародышевых мешка (рис. 1, 4). На ценоцитных стадиях зародышевый мешок растет в апикальном направлении, постепенно разрушая центральную часть париетальной ткани, и достигает нуцеллярного колпачка, сохраняющегося долгое время. Следует отметить, что при развитии двух зародышевых мешков нуцеллярный колпачок тоже практически полностью разрушается. Вероятно, развитие двух гаметофитов требует больше питательных веществ, что приводит к большему разрушению тканей нуцеллуса.

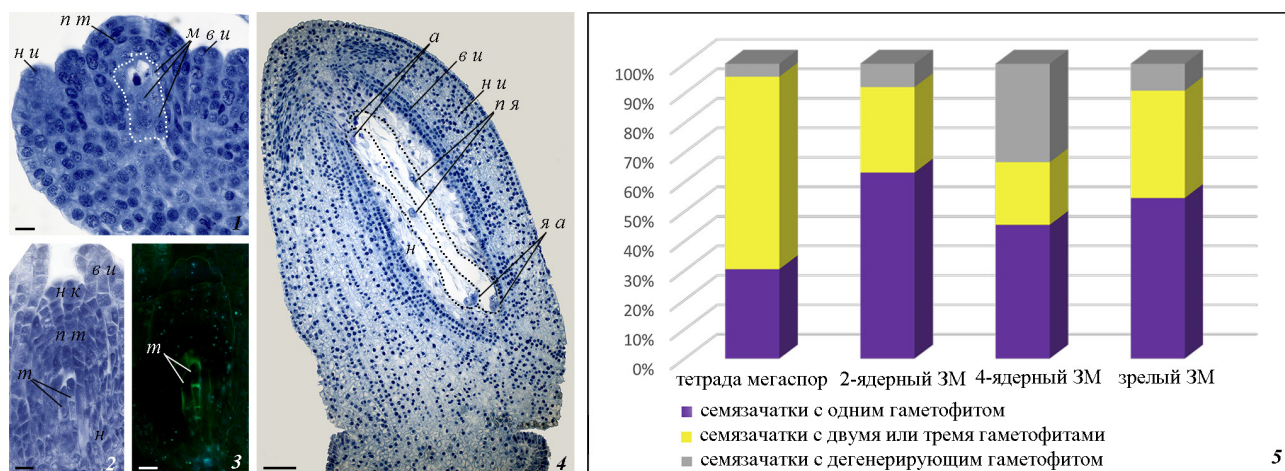


Рис. 1. Развитие нескольких зародышевых мешков в семязачатке. 1 – спорогенный комплекс на ранних стадиях развития семязачатка (границы обозначены пунктиром), 2–3 – образование нескольких тетрад мегаспор (2 – микроскопия в светлом поле, 3 – флуоресцентная микроскопия), 4 – два зрелых зародышевых мешка (границы обозначены пунктиром), 5 – соотношение развития одного и двух гаметофитов в семязачатке. Условные обозначения: а – антиподы, в и – внутренний интегумент, ЗМ – зародышевый мешок, м – мегаспороцит, н и – наружный интегумент, н к – нуцеллярный колпачок, п т – париетальная ткань, п я – вторичное полярное ядро, т – тетрада мегаспор, я а – яйцевой аппарат. Шкала: 1–3 – 20 мкм, 4 – 100 мкм.

Анализ соотношения семязачатков с одним или несколькими (2–3) развивающимися гаметофитами (рис. 1, 5) показал, что после мейоза семязачатков с несколькими тетрадами мегаспор почти в 2 раза больше, чем с 1 тетрадой. Однако, дальнейшего развития дополнительные тетрады часто не получают и соотношение семязачатков с одним и двумя зародышевыми мешками на 2- и 4-ядерной стадиях существенно изменяется в сторону одного зародышевого мешка. Дегенерирующие тетрады могут долго присутствовать в семязачатке рядом с развивающимся ценоцитным зародышевым мешком. По мнению J. L. Walters (1962), наблюдавшего подобную картину у *P. californica*, остановка развития мегаспор может быть связана с нарушениями мейоза. У *P. anomala* остановка развития иногда происходит

во всех тетрадах, в результате не развивается ни одного гаметофита. Значительный процент гибели зародышевых мешков наблюдался также на 4-ядерной стадии (рис. 1, 5). Отсутствие гаметофита приводит к остановке развития семязачатка и его последующей дегенерации. Несмотря на деструкцию некоторых гаметофитов в процессе развития, частота развития двух зародышевых до зрелого состояния у *P. anomala* все же высока (рис. 1, 5).

Зрелый зародышевый мешок – узкий, длинный, занимает практически всю центральную часть нуцеллуса, на его микропилярном полюсе формируется яйцевой аппарат из яйцеклетки и двух синергид, имеющих в своей базальной части нитчатый аппарат. На противоположном полюсе зародышевого мешка формируются три антиподы; полярные ядра в центральной клетке сливаются перед оплодотворением, формируя вторичное полярное ядро, расположенное в центре.

К моменту раскрытия цветка у *P. anomala* мужские и женские репродуктивные структуры полностью готовы к процессу опыления и оплодотворения. В пыльниках созревшая 3-клеточная пыльца, по нашим данным, имеет высокую фертильность – 95 % (рис. 2, 1), что подтверждается также высоким процентом ее прорастания (76 %) на искусственной среде и нормальным ростом пыльцевых трубок (рис. 2, 2, 3). Свежесобранная пыльца начинает прорастать на среде через 1–2 часа, через 3 часа отмечается максимум ее прорастания. Попадая на рыльце, пыльца также начинает сразу прорастать. Рыльце широкое, гребневидное, по внешнему краю проходит небольшой канал, выстланный железистыми клетками – воспринимающая поверхность рыльца. Поверхностный канал рыльца переходит в канал столбика, также выстланный секреторными клетками, активно вырабатывающими слизь, по которой растут пыльцевые трубки внутри канала. Воспринимающая поверхность рыльца становится активной на следующий день после раскрытия цветка, рыльце полностью покрыто многочисленными пыльцевыми зернами, которые начинают прорастать (рис. 2, 4–6). На 2–3 день после раскрытия цветка многочисленные пыльцевые трубки видны в канале столбика. На 3–4 день они достигают семязачатков и входят в микропиле (рис. 2, 7), осуществляется оплодотворение.

Попадая в зародышевый мешок, пыльцевая трубка входит в одну из синергид, что характерно для большинства растений, поскольку синергиды обладают специальными физиологическими и молекулярными механизмами для привлечения пыльцевых трубок (Dresselhaus et al., 2016; Susaki et al., 2023). Оплодотворение (сингамия) осуществляется по премитотическому типу (по классификации Е. Н. Герасимовой-Навашиной, 1971), т.е. ядро спермия сливается с ядром яйцеклетки до вступления обоих ядер в профазу митоза, формируется зигота, которая вступает на некоторое время в покой, продолжающийся, как правило, 1–2 суток. Тройное слияние происходит сходным образом, спермий сливается с вторичным полярным ядром, формируя первичное ядро эндосперма. В отличие от зиготы, ядро эндосперма сразу приступает к делению, формируя эндосперм нуклеарного типа. К моменту первого деления зиготы в эндосперме присутствует 4 ядра, попарно расположенных на микропилярном и халазальном концах ценоцита. Первое и несколько последующих делений зиготы у *P. anomala*, как и у других пионов, происходят без цитокинеза, что соответствует Раeoniad-типу эмбриогенеза.

В некоторых случаях отмечено вхождение в семязачаток двух или более пыльцевых трубок, как правило, они входят в синергиды одного яйцевого аппарата, а дальше расходятся к близлежащим женским половым клеткам. Интересная особенность была нами выявлена в семязачатках с двумя зародышевыми мешками при вхождении только одной пыльцевой трубки в синергиду яйцевого аппарата одного из зародышевых мешков. После выхода спермиев из пыльцевой трубки они ведут себя нетипично: оба спермия расходятся к яйцеклеткам яйцевых аппаратов разных зародышевых мешков, граница между которыми в процессе развития практически полностью разрушается. В данном случае формируется две зиготы, а полярные ядра обоих зародышевых мешков остаются неоплодотворенными и эндосперм не развивается. В отсутствии эндосперма зародыш также не способен к дальнейшему развитию, в результате чего в данном семени оба зародыша дегенерируют. Поскольку семязачатков с 2 зародышевыми мешками в нашем материале наблюдалось много, такое поведение спермиев может существенно снижать эффективность оплодотворения, приводя к нарушению развития семян.

Подсчет формирующихся семян у изучаемых растений данного вида, показал, что реальная семенная продуктивность составляет только 37 % от общего числа семязачатков, которые закладываются в плодолистиках. Возможно, одним из факторов снижения семенной продуктивности могут быть отмеченные нами нарушения, как в процессе развития зародышевого мешка, так и в процессе оплодотворения.

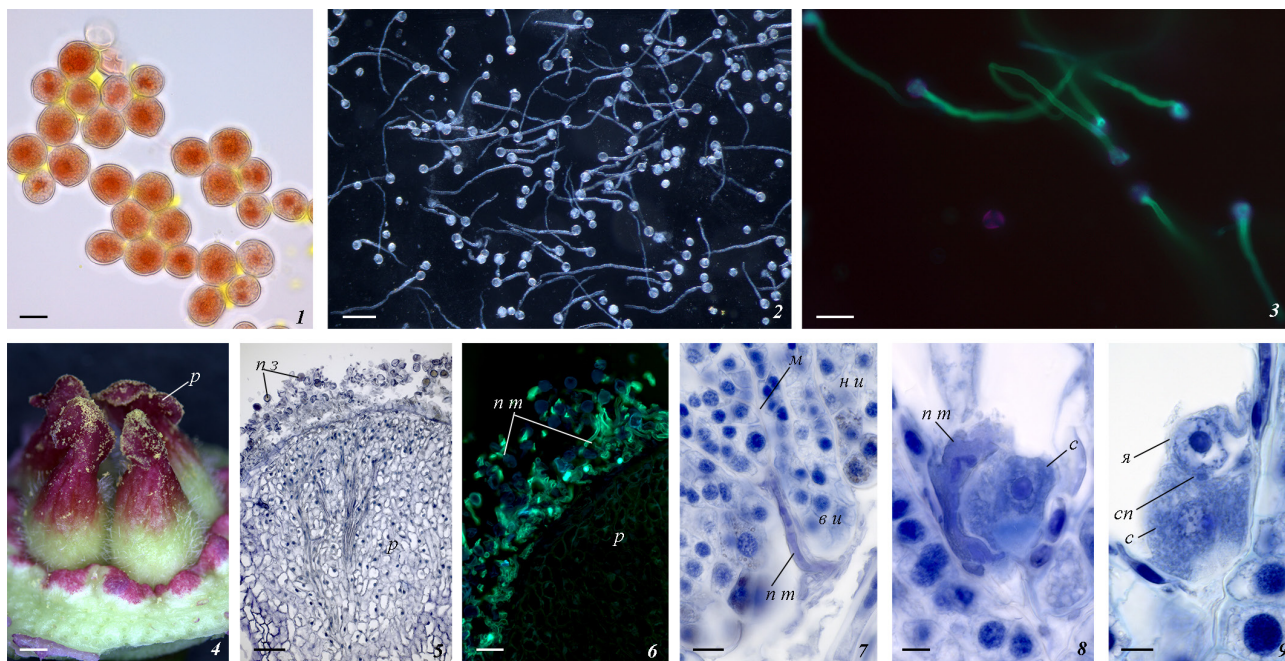


Рис. 2. Жизнеспособность пыльцы и процесс оплодотворения. 1–3 – высокая фертильность пыльцевых зерен, выявленная различными методами: окраской ацетокармином (1) и прорастиванием пыльцы (2) с последующей окраской анилиновым синим для визуализации (3), 4 – пыльца на рыльце, 5–6 – прорастание пыльцевых зерен на рыльце (5 – микроскопия в светлом поле, 6 – флуоресцентная микроскопия), 7 – рост пыльцевой трубки в микропиле, 8 – вхождение пыльцевой трубки в одну из синергид, 9 – контакт спермия с яйцеклеткой. Условные обозначения: в и – внутренний интегумент, м – микропиле, н и – наружный интегумент, п т – пыльцевая трубка, р – рыльце, с – синергида, сп – спермий, я – яйцеклетка. Шкала: 1, 7 – 20 мкм, 2, 5 – 100 мкм, 3, 6 – 50 мкм, 4 – 1 мм, 8, 9 – 10 мкм.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00276, <https://rscf.ru/project/24-26-00276/>. Техническая часть исследования проведена на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института имени В. Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург). Авторы благодарны сотрудникам Ботанического сада имени Петра Великого БИН РАН за предоставление растительного материала для исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамова Л. И., Орлова И. Н., Вишнякова М. А., Константинова Л. Н., Орел Л. И., Огородникова В. Ф. Цитологическая и цитозембриологическая техника (для исследования культурных растений). Методические указания. – Л.: ВИР, 1981. – 118 с.
- Батыгина Т. Б. Раеопиад-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. – СПб: Мир и семья, 1997. – Т. 2. Семья. – С. 526–528.
- Герасимова-Навашина Е. Н. Двойное оплодотворение покрытосеменных и некоторые его теоретические аспекты // Проблемы эмбриологии. – Киев: Наукова думка, 1971. – С. 113–152.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 255 с.
- Реут А. А., Миронова Л. Н. Изучение аминокислотного и элементного состава растительного сырья некоторых представителей рода *Paeonia* L. // Бюл. Бот. сада СГУ, 2013. – № 11. – С. 165–169.
- Шамров И. И. Развитие семязачатка и семени у *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae) // Бот. журн., 1997. – Т. 82, № 6. – С. 24–46.
- Яковлев М. С., Иоффе М. Д. Мегаспорогенез у *Paeonia anomala* L. // Вопросы эволюции, биогеографии, генетики и селекции. – М.–Л.: Наука, 1960. – С. 320–325.
- Яковлев М. С., Иоффе М. Д. Особенности эмбриогенеза рода *Paeonia* L. // Бот. журн., 1957. – Т. 42, № 10. – С. 1491–1502.
- Яковлев М. С., Иоффе М. Д. Эмбриология некоторых представителей рода *Paeonia* L. // Морфология цветка и репродуктивный процесс у покрытосеменных растений. – М.–Л.: Наука, 1965. – С. 140–176.
- Carniel K. Über die Embryobildung in der Gattung *Paeonia* // Österr. Bot. Zeit., 1967. – Bd. 114. – Ss. 4–19.
- Chen T., Xie M., Jiang Y., Yuan T. Abortion occurs during double fertilization and ovule development in *Paeonia ludlowii* // J. Plant Research, 2022. – Vol. 135, № 2. – P. 295–310. <http://doi.org/10.1007/s10265-021-01366-5>
- Dresselhaus T., Sprunck S., Wessel G. M. Fertilization mechanisms in flowering plants // Current Biology, 2016. – Vol. 26. – P. R125–R139. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.032>

Du Y., Cheng F., Zhong Y. Induction of direct somatic embryogenesis and shoot organogenesis and histological study in tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2020. – Vol. 141. – P. 557–570. <http://doi.org/10.1007/s11240-020-01815-4>

Halda J. J. The Genus *Paeonia*. – Portland: Timber Press Inc., 2004. – 231 p.

Öztürk R., Ünal M. Cytoembryological studies on *Paeonia peregrina* L. // J. Cell Mol. Biol., 2003. – Vol. 2. – P. 85–89.

Rodkiewicz B., Bednara J. Megasporogenesis // Embryology of flowering plants. Terminology and concepts. NH, USA: Enfield, 2002. – Vol. 1. Generative organs of flower. – P. 114–115.

Susaki D., Izumi R., Oi T., Takeuchi H., Shin J. M., Sugi N., Kinoshita T., Higashiyama T., Kawashima T., Maruyama D. F-actin regulates the polarized secretion of pollen tube attractants in *Arabidopsis* synergid cells // Plant Cell, 2023. – Vol. 35. – P. 1222–1240. <http://doi.org/10.1093/plcell/koac371>

Vinogradova G. Yu., Zhinkina N. A. Why does only one embryo sac develop in the *Paeonia* ovule with multiple archesporium? // Plant Biology, 2021. – Vol. 23, № 2. – P. 267–274. <http://doi.org/10.1111/plb.13206>

Walters J. L. Megasporogenesis and gametophyte selection in *Paeonia californica* // Amer. J. Bot., 1962. – Vol. 49, № 7. – P. 787–794. <http://doi.org/10.2307/2439173>