

А. И. ЗДРУЙКОВСКАЯ-РИХТЕР, М. С. БАБАСЮК

ОПЫЛЕНИЕ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ СЕМЯПОЧЕК В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

(Представлено академиком М. Х. Чайлагином 12 VII 1974)

После первых успешных работ по опылению и оплодотворению в условиях *in vitro*, проведенных индийскими учеными на маке⁽¹⁾, эти процессы были осуществлены разными авторами и на других объектах⁽²⁻¹⁰⁾. Аналогичные исследования проводятся в Никитском ботаническом саду^(11, 12). В данной статье излагаются результаты исследований, полученных на семяпочках *Nicotiana tabacum* L. (сорт Дюбек), при совместной их культуре в условиях *in vitro* с пылью того же сорта.

Основной задачей исследований было совершенствование методических приемов, позволяющих получить максимальное число случаев двойного оплодотворения и массовое развитие полноценных семян и растений, а также цитозембриологическое изучение развивающихся культур.

В связи с этим решались методические вопросы: способ получения асептической и жизнеспособной пыли, оптимальные сроки изолирования семяпочек и пересадки их вместе с пыльцевыми зернами в пробирки с питательными средами, подбор питательной среды, подходящей как для роста пыльцевых трубок, так и благоприятной для плаценты с семяпочками и др. Для изучения поведения пыли и семяпочек в культуре *in vitro*, их взаимоотношений и наличия оплодотворения материал фиксировался и готовились постоянные препараты.

Из испытанных способов получения неинфицированной и жизнеспособной пыли лучшим оказался способ, при котором пыльники изолировались в асептических условиях из бутонов в стадии перед их раскрытием и помещались в стерильные пробирки, закрытые рыхлыми ватными тампонами. В этих условиях они подсыхали и растрескивались, освобождая пыльцу.

В процессе исследования лучшие результаты выявились при использовании половинки плаценты (с семяпочками), изолированной из завязей в первый и второй дни цветения, при культуре их со свежесобранной пылью, внесенной в культуры тотчас после пересадки семяпочек в питательные среды. Контролем служили семяпочки, культивируемые в тех же условиях, но без присутствия пыли. Выращивание проводили в условиях естественного освещения при температуре 25–30°. В опытные культуры пыльца помещалась или на поверхность плаценты с семяпочками или в питательную среду. Более успешным был первый способ. Испытывали различные приемы внесения пыли в культуры: с помощью шпателя, кусочков резинки, укрепленных на кончике иголок, волосяными кисточками, а также пипетками (наносилась капля суспензии пыльцевых зерен в водном растворе сахарозы).

Оказалось, что способ внесения пыли в культуры и ее количество являются одним из решающих факторов в осуществлении процесса оплодотворения и развития семян. При очень большом количестве пыльцевых зерен, образующих при прорастании войлок из пыльцевых трубок, обволакивающих семяпочки и сосредотачивающихся между семяпочками и плацентой (рис. 1), наблюдалось сильное угнетение всех процессов и быстрая



Рис. 1. Участок двухдневной культуры плаценты *Nicotiana tabacum* L. с семечками и массой пыльцевых трубок (*n.t.*) на поверхности семечек (*c*), между семечками и плацентой (*n.l.*). Окраска основным фуксином по Фельгену с подкраской светло-зеленым



Рис. 3. Зародышевый мешок из семечки *N. tabacum* L. (сорт Дюбек) с зиготой и первичным ядром эндосперма, 2 суток после опыления *in vitro*. Метод окраски тот же, что и на рис. 1

гибель культур. В таких вариантах вхождение пыльцевых трубок в микропиле семяпочек отмечалось в единичных случаях, а процессы оплодотворения и развития семян не наблюдались вовсе. Одной из причин угнетения культур является, вероятно, чрезмерное количество физиологически активных веществ, выделяемых пыльцевыми трубками. Содержание большого разнообразия физиологически активных веществ в пыльцевых зернах и пыльцевых трубках выявлено многими авторами (13-15).

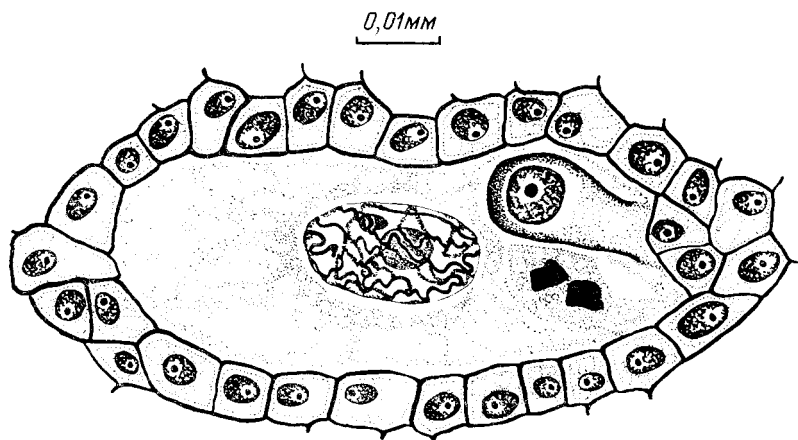


Рис. 2. Продольный срез семени *N. tabacum* L., развившегося в результате двойного оплодотворения в культуре *in vitro* (18 дней после опыления и культивирования). Метод окраски тот же, что и на рис. 1

В экспериментах при более или менее оптимальном количестве пыльцевых зерен и равномерном их распределении на плаценте с семяпочками, как правило, наблюдали нормальные процессы оплодотворения, приводящие к массовому развитию и созреванию семян. Дозировка количества пыльцы осуществлялась следующим образом. К пыльце из определенного числа пыльников приливалось асептически определенное число кубических сантиметров водного раствора сахарозы. Каплю суспензии вносили в культуру. Наилучший эффект получен при применении свежеприготовленной суспензии пыльцы из 10-20 пыльников в 1 см³. Равномерное опыление осуществлялось и при использовании сухой пыльцы путем встряхивания ее над плацентами, разложенными в чашках Петри на тонком слое агаризованной питательной среды, с последующим их перенесением в пробирки с питательной средой для длительной культуры. Однако этот способ не позволяет дозировать количество пыльцы. Испытывали две питательные среды: Нича и Уайта с 4% сахарозы и различными добавками. Наилучшей оказалась среда, содержащая соли и витамины по Уайту (в мг/л): дрожжевой экстракт «Difco» 200, казеиновый гидролизат 400, кинетин 0,01, ИУК 0,01. При изучении материала выявлена определенная ориентация пыльцевых трубок к семяпочкам и плаценте. Пыльцевые трубки проходили между семяпочками, и некоторые из них направлялись к микропиле. Большое количество пыльцевых трубок скапливалось между семяпочками и плацентой. Впоследствии они подвергались деструктивным изменениям. В пыльцевых трубках четко видны генеративные клетки, а также спермии в разных стадиях формирования. Зародышевые мешки культивируемых семяпочек в момент внесения пыльцы были, как правило, сформированными. Ядра яйцеклеток, синергид и антипод имели положительную реакцию при окраске по Фельгену. Особенно интенсивно красились антиподы. Позарные ядра имели очень слабую реакцию.

В процессе культивирования наблюдалось увеличение размеров оцеленных семяпочек и, соответственно, зародышевых мешков. Рост последних происходил за счет лизиса клеток покровов семяпочек, прилегающих

к зародышевым мешкам. Местом попадания пыльцевой трубки в зародышевый мешок во всех наблюдаемых нами случаях была синергида. Процессы оплодотворения осуществлялись в течение первых двух суток и позже. Через 2—4 суток после внесения пыльцы многие семечки содержали зиготы и первичные ядра эндосперма (рис. 3) или зиготы и 2—4 клетки эндосперма. Последние обычно расположены вдоль зародышевого мешка одна под другой. Деление зиготы наблюдали через 5—7 суток с начала культивирования. В период 6—10 суток многие семечки содержали 6—8-клеточные проэмбрио и шаровидные зародыши разных размеров, а че-



Рис. 4. Сеянцы *N. tabacum* L., развившиеся из семян, возникших из семечек, оплодотворенных *in vitro*

рез 17—18 дней часть семян содержала дифференцированные зародыши нормальных размеров (рис. 2). Для получения полноценных растений лучшим вариантом условий было культивирование семян в Т-образных пробирках, укрепленных на аппарате роллерного типа в жидкой питательной среде Уайта, дополненной казеиновым гидролизатом (400 мг/л). Разработанные нами методические приемы позволили получить массовое развитие семян и полноценных растений (рис. 4) из оплодотворенных семечек в условиях *in vitro*.

Эксперименты по опылению и оплодотворению *in vitro* имеют большое значение. При разработке этого метода применительно к разным объектам предоставляется возможность решать не только многие теоретические вопросы цитоэмбриологии, но и создавать новые формы организмов, преодолевая барьеры несовместимости, лежащие в тканях пестика.

Государственный Никитский ботанический сад
Ялта

Поступило
27 VI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Kanta, N. S. Rangaswamy, P. Maheshwari, Nature, v. 194, 12 (1962). ² K. Kanta, P. Maheshwari, Phytomorphology, v. 13, 230 (1963). ³ P. S. Rao, Fyton (Argentina), v. 22, 165 (1965). ⁴ K. R. Shivanna, Phytomorphology, v. 15, 183 (1965). ⁵ S. V. Usha, Curr. Sci., v. 34, 511 (1965). ⁶ M. Zenkteler, Naturwiss., B. 52, 645 (1965). ⁷ H. L. Dulieu, Phytomorphol., v. 16, 67 (1966). ⁸ M. Zenkteler, Experientia, v. 23, 775 (1967). ⁹ T. Kameya, K. Hinata, Japan. J. Breeding, v. 20, 5, 253 (1970). ¹⁰ V. Balatkova, J. Turu, Biologia plantarum (Praha), v. 14, 1, 82 (1972). ¹¹ А. И. Здруйковская-Рихтер, V Всесоюз. совещ. по эмбриологии растений, Кишинев, 1971. ¹² А. И. Здруйковская-Рихтер, М. С. Бабасюк, V З'їзд. Українськ. ботаніч. товариства, тез., Ужгород, 1972. ¹³ Н. И. Якушкина, ДАН, т. 56, № 5, 549 (1947). ¹⁴ Е. А. Бригигов, Р. Н. Лашеникова, В. Я. Виссарионова, Физвол. раст., т. 2, 5, 432 (1955). ¹⁵ В. А. Поддубная-Арнольди, Н. В. Цингер и др., Тр. Главн. бот. сада АН СССР, т. 8, 162 (1964).