

ЭМБРИОЛОГИЯ ОДНОЛЕТНИХ ВИДОВ РОДА ЛЮЦЕРНА (MEDICAGO L., FABACEAE)

В. А. ВЕРЕЩАГИНА,

доктор биологических наук, профессор,

Л. В. НОВОСЕЛОВА,

доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры ботаники и генетики растений,

Пермский государственный национальный исследовательский университет

614990, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15; тел. 8(342)277-68-62;
e-mail: vva@psu.ru, novoselova@psu.ru

Положительная рецензия представлена С. Л. Елисеевым, доктором сельскохозяйственных наук, профессором, заведующим кафедрой растениеводства Пермской государственной сельскохозяйственной академии.

Ключевые слова: люцерна, генетические ресурсы, однолетние и многолетние виды, эмбриология, семенная продуктивность, *Medicago*, световая микроскопия, люминесцентная микроскопия, пыльцевые зерна, семязачатки.

Keywords: *Lucerne*, genetic resources, annual and perennial species, embryology, seed productivity, light microscopy, luminescent microscopy, pollen grains, seed ovules.

Цель и методика исследований.

Род Люцерна (*Medicago*) включает 83 вида, из которых 62 относятся к однолетним растениям. Возделывается 4 многолетних вида и столько же однолетних. Наибольшее число сортов зарегистрировано у люцерны посевной (*M. sativa*). Многие из них характеризуются низкой семенной продуктивностью, это объясняется недостатком насекомых-опылителей и генетической системой самонесовместимости, блокирующей прорастание собственной пыльцы на рыльце цветка. В связи с этим особое значение приобретает изучение однолетних видов рода *Medicago*, которые являются донорами генов автофертильности (система самонесовместимости не работает) и автотриппинга (опыление происходит без участия опылителей).

Цель нашей работы — изучение генетических ресурсов растений рода *Medicago* для использования полученных данных в селекционных программах. Это многоэтапный процесс, включающий изучение цветения и опыления на широком эколого-географическом материале, эмбриологии и семенной продуктивности. На важное значение таких исследований для практической селекции указывал еще Н. И. Вавилов [1]. В данной статье мы рассматриваем результаты эмбриологического анализа однолетних видов рода *Medicago* в сопоставлении их с ранее полученными данными по многолетним видам [2].

В период с 1986 г. исследована эмбриология 26 однолетних видов рода *Medicago*, представленных более чем 480 образцами различного географического происхождения, собранными в экспедиционных условиях и находящимися в коллекции ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова. За период работы проведены наблюдения за растениями из дикорастущих ценопопуляций и на коллекционных участках, выполнено около 3000 фиксаций цветков, изготовлено более 8000 препаратов из завязей и 2000 препаратов из пыльников. Для анализа препаратов использовалась световая и люминесцентная микроскопия. Полученные в ходе исследования данные обработаны статистически.

Результаты исследований.

Развитие и фертильность пыльцевых зерен.

Пыльники люцерны четырехгнездные, стенка пыльника формируется по типу двудольных. Самые ранние стадии развития пыльников наблюдаются в крошечных бутонах, расположенных в пазухах листьев. В этот период ткань пыльника уже дифференцирована: выделяется спорогенная ткань и стенка пыльника, которая в

период мейоза микроспороцитов включает эпидермис, эндотеций, средний слой и тапетум. Одноядерный тапетум секреторного типа дегенерирует ко времени обособления микроспор. Стенка зрелого пыльника образована эпидермисом и эндотецием; клетки эндотеция вытянуты в радиальном направлении и имеют фиброзные утолщения; клетки эпидермиса уплощены. Зрелая стенка пыльника у всех видов имеет сходное строение. Спорогенные клетки располагаются в 1–2 слоя, у них крупные ядра. Образование микроспор симультанное, расположение их тетраэдрическое. Высвобождение микроспор в пределах цветка и даже пыльника асинхронно. Зрелые пыльцевые зерна двухклеточные, округлые, трехпоровые. У *M. intertexta* обнаружены пыльцевые зерна с четырьмя порами. Средняя величина зрелых пыльцевых зерен у однолетних видов варьирует от 25,2 мкм у *M. lupulina* до 53,4 мкм у *M. turbinata* по полярной оси и от 22,2 мкм до 52,2 мкм у этих же видов в поперечнике по экватору. Соотношение этих величин наиболее близко к единице (1,02) у *M. turbinata*, наибольшее (1,14) — у *M. lupulina*. В процессе развития, с момента образования одноклеточного пыльцевого зерна до зрелого двухклеточного, линейный размер по полярной оси увеличивается в 1,5–2,4 раза. Размеры пыльцевых зерен у многолетних видов люцерны по диаметру варьируют от 22,8 мкм до 43,4 мкм. *M. difalcata* и *M. trautvetteri* достоверно отличаются от остальных видов по размерам пыльцевых зерен. Среди последних выделяются две группы: *M. soegrulea*, *M. quasifalcata*, *M. polychroa*, *M. sativa* с пыльцевыми зернами от 33,8 до 34,6 мкм и *M. glutinosa*, *M. falcata*, *M. cancellata* с пыльцевыми зернами 35,8–36,5 мкм. Менее всего из многолетних видов варьируют по размерам пыльцевых зерен *M. difalcata* и *M. polychroa*. Наименьшие размеры пыльцевых зерен зарегистрированы у диплоидных видов, несколько крупнее пыльцевые зерна тетраплоидов, самые крупные — у гексаплоидного вида *M. cancellata* [2, 3].

Фертильность пыльцевых зерен изучена у 167 коллекционных образцов однолетних видов. Средний показатель фертильности пыльцевых зерен высок и колеблется от 85 % до 100 %. У 8 из 18 видов обнаружены коллекционные образцы с 100 % фертильностью пыльцевых зерен. Средний процент фертильности по 9 многолетним видам [3] варьировал от 67,2 до 83,9, но в пределах каждого вида встречаются как высоко-, так и среднефертильные растения. Наиболее высока фертильность у *M. difalcata* и *M. falcata* — 80 % растений этих



видов имеют 76–100 % фертильных пыльцевых зерен. Наиболее варьирует фертильность у *M. coerulea*, у которой лишь 38,5 % изученных образцов имеют пыльцевые зерна с таким же высоким процентом фертильности. *M. sativa* по фертильности занимает промежуточное место среди исследованных видов. У многолетних видов не обнаружено ни одного коллекционного образца со 100 % фертильностью или высокостерильного. В целом в развитии пыльника и пыльцевых зерен однолетних видов не выявлено каких-либо отличий от многолетних видов *Medicago*. Раннее развитие мужского гаметофита, созревание которого происходит задолго до раскрытия цветка, в зеленых бутонах, скрытых чашелистиками, характерно и для многолетних, и для однолетних видов люцерны. Отличительной чертой однолетних видов *Medicago* является прорастание пыльцевых зерен в пыльниках.

Развитие и фертильность зародышевых мешков.

Все исследованные виды люцерны имеют кампелотропные, крассинуцеллятные, двупокровные семязачатки. Самый верхний семязачаток со стороны рыльца обычно повернут к столбику, в то время как остальные — к основанию завязи. Число семязачатков у разных видов люцерны различно, но постоянно у каждого вида. Число семязачатков в завязи у исследованных однолетних видов *Medicago* варьирует от 1 у *M. lupulina* до 15 у *M. orbicularis*. Наибольшее среднее число семязачатков зарегистрировано у *M. orbicularis* ($13,3 \pm 0,5$) и *M. intertexta* ($9,3 \pm 0,5$). Коллекционные образцы одного вида, разные по происхождению, не отличаются существенно по числу семязачатков в завязи.

Общее число закладывающихся в завязи семязачатков у многолетних видов [4] колеблется от 5,8 у *Medicago cancellata* до 9,6 у *M. coerulea*. Число семязачатков не коррелирует ни с длиной пестика, ни с размерами цветка, хотя длина пестика от основания завязи до кончика рыльца наименьшая у *M. cancellata* (в среднем 4,8 мм при длине распутившегося цветка 6,1 мм), но самые длинные пестики отмечены у *M. trautvetteri* (5,7 мм и 8,1 мм соответственно), среднее число семязачатков в завязи которых занимает промежуточное положение (9,0). У всех исследованных видов люцерны обнаруживается дегенерация части семязачатков до опыления. Среднее число стерильных семязачатков на завязь для разных видов невелико (1–2) и в разные годы непостоянно, этот признак не является видовым.

В результате мейоза наряду с линейными тетрадами макроспор формируются и тетраэдрические. Халазальная макроспора из тетрады образует зародышевый мешок, остальные макроспоры дегенерируют, их остатки сохраняются длительное время. Зародышевый мешок развивается по *Polygonum*-типу. Антиподы эфемерны, они дегенерируют в процессе созревания зародышевого мешка. После обособления клеток яйцевого аппарата антипод и центральной клетки начинается увеличение размеров зародышевого мешка, которое идет параллельно с развитием бутона.

В созревающем зародышевом мешке в центральной клетке и яйцеклетке откладывается большое число крахмальных зерен; вычлененные зародышевые мешки, окрашенные йодидом калия, практически черного цвета. Мы подразделили крахмальные зерна, встреченные у однолетних видов, по размерам на крупные, мелкие и пылевидные. Пылевидные крахмальные зерна присутствуют в зародышевом мешке и в интегументах семязачатка. Они обнаруживаются в зародышевом мешке на всех стадиях его развития. Крупные и мелкие

крахмальные зерна присутствуют только в зародышевом мешке. По наличию или отсутствию в зародышевом мешке крахмальных зерен определенного размера однолетние виды *Medicago* отличаются друг от друга. Большинство видов имеют крупные и пылевидные крахмальные зерна: *M. intertexta*, *M. orbicularis*, *M. arabica*, *M. scutellata*, *M. turbinata*. Причем у *M. scutellata* иногда крупные крахмальные зерна отсутствовали и присутствовали только пылевидные. У *M. turbinata* в разных зародышевых мешках встретились крупные и пылевидные крахмальные зерна или мелкие и пылевидные. У *M. lupulina* обнаруживаются только мелкие и пылевидные крахмальные зерна, а в отдельных случаях — только пылевидные. У видов, в зрелых зародышевых мешках которых присутствуют крупные крахмальные зерна, установлено постепенное увеличение размеров крахмальных зерен в процессе развития зародышевого мешка. Время появления крупных и мелких крахмальных зерен различно. Мы наблюдали появление крахмальных зерен в стадии двуядерного мешка у *M. scutellata*, *M. orbicularis*, *M. turbinata*, *M. lupulina*. У *M. intertexta* крахмальные зерна появляются на стадии четырехядерного зародышевого мешка. В зрелом зародышевом мешке у всех видов присутствует большое количество крахмальных зерен. Крахмальные зерна чаще всего скапливаются в центральной клетке, около полярных ядер, но нередко весь зародышевый мешок заполнен крахмальными зернами. В норме зародышевый мешок может содержать разное количество крахмальных зерен. Чаще всего встречались мешки с очень большим содержанием крахмальных зерен. Зародышевый мешок окружен углеводной оболочкой, которая становится заметной на стадии двуядерного зародышевого мешка. Толщина углеводной оболочки различна у разных видов. Самая мощная углеводная оболочка встретилась у *M. lupulina*, у *M. arabica*, *M. orbicularis*, *M. turbinata* она очень тонкая. Зародышевые мешки, содержащие большое число крахмальных зерен, мы относили к фертильным. У однолетних видов к стерильным можно отнести зародышевые мешки длиной менее 100 мкм; зародышевые мешки, в которых (в результате нарушения синтеза крахмала), во-первых, встречаются мелкие крахмальные зерна у видов, для которых характерны в норме крупные крахмальные зерна; во-вторых, отсутствуют пылевидные крахмальные зерна у видов с мелкими и пылевидными зернами; в-третьих, зародышевые мешки с толстой углеводной оболочкой.

В развитии семязачатков и зародышевых мешков многолетних видов [5] выявлены нарушения: гибель семязачатков происходит на всех стадиях развития завязи и семязачатков, начиная с заложения спорогенной ткани — археспориальных клеток — до момента созревания семян. Генетически закрепленная частичная гибель женского гаметофита наблюдается у видов как с малым, так и с достаточно большим числом семязачатков в завязи. Аномалии в строении семязачатков разнообразны, частота их встречаемости варьирует как у разных растений одного вида, так и между видами. Подобные нарушения выявлены и у однолетних видов люцерны, но они единичны.

Двойное оплодотворение. Зародыш и эндосперм. Семенная продуктивность.

Период времени от начала прорастания пыльцы на рыльце до двойного оплодотворения составляет от 4 до 24 часов у разных видов. Процесс двойного оплодотворения у однолетних и многолетних видов рода *Medicago* не имеет особых отличий. Оплодотворение порогамное, пыльцевая трубка изливает свое содержимое в



одну из синергид, иногда разрушенными оказываются обе синергиды. Зигота после некоторого периода созревания делится поперечной перегородкой, образуя апикальную и базальную клетки. У многолетних видов первое деление зиготы отмечено через 48 часов после опыления, когда формируются 4–6 ядер эндосперма. У однолетних видов через 48 часов после искусственного триппинга наблюдались линейные и шаровидные зародыши с суспензором. У многолетних видов после принудительного самоопыления нормальное развитие зародыша выявлено в 2–3 семязачатках завязи (общее количество семязачатков в завязи от 5 до 15), в остальных семязачатках обнаружены дегенерирующие неоплодотворенные зародышевые мешки. У однолетних видов почти все семязачатки оплодотворены. Развитие зародыша исследованных видов идет по типу *Caruophyllad*, вариации *Medicago*. Длина подвеска варьирует в зависимости от числа образующих его клеток. У многолетних видов соотношение числа семян и числа закладывающихся семязачатков составляет 1 : 10, у однолетних видов при благоприятных условиях в большинстве случаев число семян близко к числу закладывающихся семязачатков.

Системы размножения.

Ранее было установлено [6, 7], что исследованные однолетние и многолетние люцерны четко различаются системами размножения. Система семенного размножения вида — сложное явление. С одной стороны, она включает структурные, морфологические приспособления в цветке к определенному типу и способу опыления. С другой — функциональные аспекты биологии цветка, генетические механизмы, такие как несовместимость, стерильность. Существует и третья сторона. В системе размножения вида и морфологические, и функциональные аспекты следует рассматривать в связи с разнообразием экологических факторов, активно действующих на процесс опыления. Способ опыления многолетних видов *Medicago* — энтомофилия. Эти виды имеют мотыльковые цветки, привлекающие насекомых своей окраской — желтой или синей, хорошо воспринимаемой зрением пчелиных. На лепестках выделяются более темно окрашенные жилки — указатели нектара. Цветки содержат пыльцу и нектар. Мотыльковый венчик охраняет пыльцу и нектар от малоэффективных опылителей. Лепестки, благодаря системе ушек, зубцов и выростов, сочленены друг с другом и действуют как единая система, обеспечивая взрывной характер раскрытия цветка — триппинг. Преимущество в опылении имеют сравнительно крупные опылители из пчелиных. Список опылителей, работающих на многолетних видах люцерны из секции *Medicago*, включает 83 вида, из них основными опылителями являются 8 [2].

Что касается типа опыления, то многолетние виды люцерны — преимущественно перекрестноопыляемые

растения. Об этом свидетельствуют морфология цветка, характер его раскрытия и опыления, а также опыты по искусственному опылению, проведенные в разных вариантах, включая принудительное самоопыление, и дополнивший их эмбриологический анализ. Самоопыление возможно, но оплодотворение предотвращается самонесовместимостью, которая обнаруживается цитозембриологически как в прогамную фазу оплодотворения, так и после него. В естественных условиях возможность образования семян в результате самоопыления у незначительной части цветков определяется автотриппингом, который явно зависит от экологических условий, прежде всего от температуры и относительной влажности воздуха.

У однолетних видов цветки мельче, при этом они также мотылькового типа и триппингующиеся. Дополнительной особенностью цветков является способность закрываться вечером и вновь открываться утром. Триппинг происходит без участия опылителей, это автотриппинг. Автотриппинг обеспечивает автогамию, и отсутствие опылителей не влияет на образование семян. Кроме того, у однолетних видов *Medicago* при эмбриологическом исследовании с использованием световой и люминесцентной микроскопии обнаружено прорастание пыльцевых зерен в гнездах пыльников и рост пыльцевых трубок в завязи бутонов и нетриппингованных цветков. Такие цветки обычны у *M. orbicularis*, *M. arabica*, *M. lupulina*. У *M. scutellata* и *M. turbinata* таких цветков существенно меньше, у *M. intertexta* они единичны, у *M. radiata* не были зарегистрированы совсем. Последний вид по морфологическим признакам стоит особняком среди других *Medicago*, и систематиками оспаривается его принадлежность к данному роду.

Выводы. Рекомендации.

Итак, у изученных видов рода *Medicago* многолетние виды в высокой степени автостерильны и аутбредны, однолетние виды автофертильны и инбредны. В пределах одного рода с морфологически однотипным строением цветка и способом подачи пыльцы реализовались две полярно ориентированные системы размножения.

Однако сравнительно-эмбриологическое изучение формирования репродуктивных органов у однолетних и многолетних видов, отличающихся системами размножения, не обнаружило существенных различий в формировании и функционировании мужского и женского гаметофитов. Различия между однолетними и многолетними видами рода *Medicago* L. заключаются лишь в количественных параметрах и темпах развития, которые можно использовать в качестве таксономических признаков. Эмбриологическое исследование подтвердило несомненное филогенетическое родство исследованных видов, имеющее генетическую основу, и перспективность межвидовых скрещиваний.

Литература

1. Вавилов Н. И. Генетика на службе социалистического земледелия // Избр. тр. : в 5 т. М. ; Л. : Наука, 1965. Т. 5. С. 262–287.
2. Верещагина В. А., Колясникова Н. Л., Новоселова Л. В. Репродуктивная биология видов рода *Medicago* L. Пермь, 2004. 225 с.
3. Верещагина В. А., Колясникова Н. Л. Эмбриология некоторых многолетних видов люцерны (*Medicago* L.) // Ботан. журн. 1990. Т. 75. № 5. С. 604–614.
4. Верещагина В. А., Колясникова Н. Л. Оценка фертильности семяпочек у некоторых многолетних видов люцерны // Проблемы репродуктивной биологии семенных растений. Л., 1993. Вып. 8. С. 104–109.
5. Верещагина В. А., Колясникова Н. Л. Потенциальная и реальная семенная продуктивность завязей разных видов люцерны // Сб. науч. тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. Л., 1986. Т. 99. С. 23–27.
6. Верещагина В. А., Новоселова Л. В., Колясникова Н. Л. Многолетние и однолетние виды *Medicago* L. — две системы размножения // Ботанические исследования в Азиатской России : материалы XI съезда РБО. Барнаул, 2003. Т. 2. С. 133–134.
7. Верещагина В. А., Новоселова Л. В. Репродуктивная биология *Medicago lupulina* (Fabaceae) // Ботан. журн. 1997. Т. 82. № 1. С. 30–38.