

УДК 581.3.582.683.2

А. Ф. Попова, Г. Ф. Іваненко

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

## Розвиток зародків *Brassica rapa* L.

### в умовах клінонстатування

---

Подаються результати порівняльного вивчення формування зародків у рослин *Brassica rapa* L. в умовах повільного горизонтального клінонстатування і лабораторного контролю. Дослідження виконано на зародках ідентифікованого віку, що досяглося маркуванням квітів після штучного запилення та використанням темпоральної фіксації матеріалу. Вивчені послідовні стадії розвитку зародків до повного їхнього диференціювання (3–21 доба після штучного запилення). Виявлена значна подібність особливостей та темпів розвитку зародків на ранніх стадіях ембріогенезу в обох варіантах. В цілому процеси диференціювання зародків в умовах повільного горизонтального клінонстатування і в лабораторному контролі протікали однаково. Проте є випадки порушень розвитку як зародкового кореня, так і сім'ядоль зародків в умовах клінонстатування. Виявлені порушення диференціювання зародків можуть бути однією із причин, зниження кількості і життєздатності насіння, сформованого в умовах зміненої гравітації.

---

#### ВСТУП

Вивчення особливостей формування насіння у вищих рослин в умовах космічного польоту й одержання декількох генерацій у цих умовах є важливим напрямком гравітаційної біології, бо це пов'язано із розробкою космічних рослинних біотехнологій для контрольованих систем життєзабезпечення на космічних літальних апаратах. Незважаючи на те, що репродуктивний розвиток рослин в умовах космічного польоту вивчався протягом тривалого часу, починаючи з 1970-х рр., насіння було отримано лише для трьох видів однорічних вищих рослин: *Arabidopsis*, *Brassica* і *Triticum*, які вирощували протягом повного онтогенезу, «від насінини до насінини», в умовах космічного польоту [1, 2, 4, 7]. На жаль, насіння, сформоване в умовах космічного польоту, за рядом характеристик (вагою, розміром, кількістю і складом запасних речовин, а також рівнем життєздатності) відрізнялося від контрольного [1, 2, 6, 8]. Це може бути результатом порушення диференціювання зародків і/чи динаміки нагромадження й балансу запасних речовин у «космічному» насінні, бо життєздатність насіння визначається насамперед ступенем акумуляції в них резервних речовин. Тому основна проблема полягає у пошуку причин відхилень в процесі

формування насінневої продукції в умовах мікрогравітації.

Модельні експерименти із використанням клінонстатування, яке дозволяє відтворювати деякі ефекти мікрогравітації (хоча в цих умовах неможливо позбутися скалярної складової гравітації), дають змогу вивчити послідовні стадії репродуктивного розвитку вищих рослин із застосуванням темпоральної фіксації матеріалу, що не завжди можливо в умовах космічного польоту. Детальне формування генеративних органів вищих рослин в умовах клінонстатування майже не вивчалось. Існують лише фрагментарні дані про формування насіння у двох видів вищих рослин в умовах клінонстатування, проте ембріологічні дослідження розвитку зародків не провадилися [3].

#### МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Як об'єкт дослідження використовували однорічну вищу рослину *Brassica rapa* L., з якою виконано ряд експериментів з вивчення репродуктивного розвитку вищих рослин в умовах мікрогравітації. Культивування рослин провадили на повільних горизонтальних клінонстатах зі швидкістю обертання платформи 2 об/хв. Рівень освітлення дослідних і

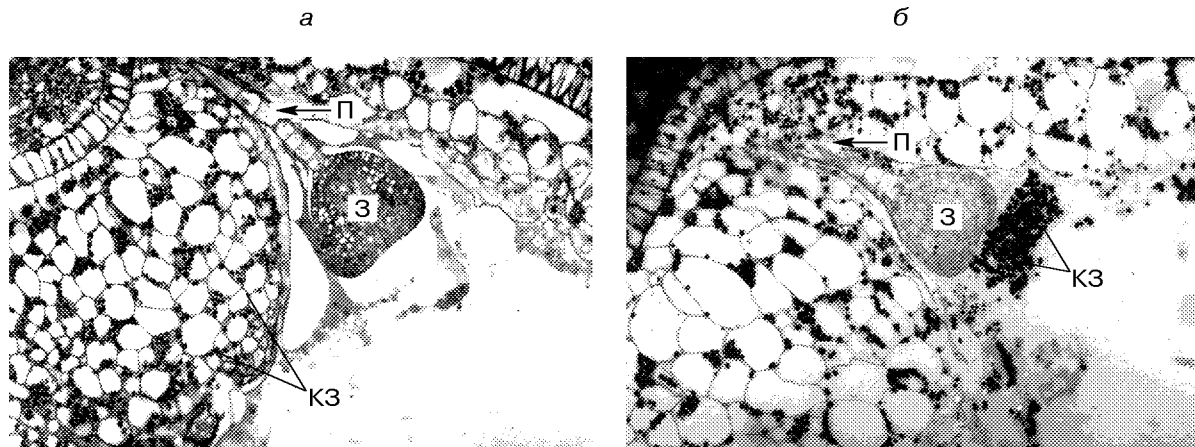


Рис. 1. Зародки *Brassica rapa* 3-добового віку (З — зародок, П — підвісок, КЗ — крохмальні зерна): а — сформовані в умовах кліностагування; б — лабораторний контроль

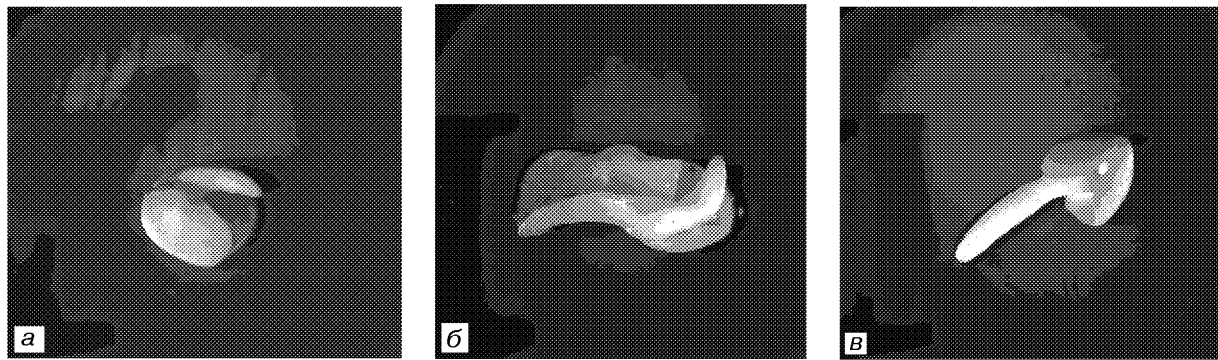


Рис. 2. Зародки *Brassica rapa*, сформовані в умовах лабораторного контролю (а) та кліностагування (б, в)

контрольних рослин складав 12 тис. люкс. Ідентифікацію віку зародків здійснювали шляхом маркування квітів після штучного запилення. Зародки перед фіксацією ізолювали із насінневих зачатків (крім 3-добових зародків через їхній дуже малий розмір та можливість їхньої втрати у процесі підготовки до мікроскопіювання). Матеріал фіксували фіксатором Карнуа, а також сумішшю розчинів 2.5 % глютарового альдегіду і 4 % параформальдегіду. Після зневоднення матеріал поміщали у парапласт чи суміш епон-аралдиту в залежності від подальшої обробки матеріалу. Зрізи виготовлені на санному мікротомі і пофарбовані основним фуксином із підфарбуванням світлим зеленим. Напівтонкі зрізи, отримані за допомогою ультрамикротому XL CM (США), використовувалися для проведення гістохімічних реакцій для виявлення запасних поживних речовин у клітинах зародка та оболонки насінини. Фотографування зрізів зародків виконували з допомогою стереомікроскопа STEMУ

SV-6 («Карл Цейс») та мікроскопа «Аксіоскоп» («Карл Цейс»).

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Порівняльний цито-ембріологічний аналіз зародків різного віку (3—21-добових), які сформувалися в умовах кліностагування і лабораторного контролю, показав, що темпи їхнього розвитку в обох варіантах на ранніх стадіях ембріогенезу в основному були подібними. Через три доби після запилення зародки мали кулясту форму з одношаровим ниткоподібним підвісом (рис. 1). Однак слід зазначити наявність у кліностагному варіанті зерен крохмалю, локалізованих у ядерному ендоспермі біля зародків (рис. 1, б), тоді як у контролі включень крохмалю у пластиди ендосперму не було (рис. 1, а).

Зародки 5-6-добового віку завдяки появі горбочків майбутніх сім'ядоль приймали серцеподібну

форму. На даній стадії розвитку в зародку зберігався багатоклітинний суспензор із одного ряду клітин переважно прямокутної форми, тоді як кінцева базальна клітина була витягнутою і звуженою. У багатоклітинному зародку на цій стадії відмічали диференціювання протодерми. З моменту появи сім'ядоль розмір останніх досить швидко збільшувався, проте до 8-9-добового віку зберігалася чітко виражена симетрія обох сім'ядоль. У цей період спостерігалось формування провідних пучків у зародковому корені та в сім'ядолях, а також поступовий ріст та згин останніх. Через 15 діб з моменту запилення зародки вже мали зародковий корінь, апікальну меристему і сформовані сім'ядолі, верхівки яких загиналися. Надалі відбувалося збільшення розміру зародків за рахунок росту сім'ядоль і зародкового кореня, причому поступово згин захоплював основу сім'ядоль і верхню частину гіпокотилу, внаслідок чого зародки досягали U-подібної стадії. Таким чином, повністю диференційовані зародки, в яких продовжувалося інтенсивне накопичення запасних речовин у сім'ядолях і в зародковому корені, спостерігалися через 21 добу після запилення. Сформовані зародки *Brassica* відносяться до хлорофілоносного типу з досить високою фотосинтетичною активністю [5].

Слід зазначити, що процеси диференціювання зародків в умовах кліностаування та в лабораторному контролі проходили в основному однаково. Проте слід відмітити, що за умов кліностаування відмічалось деяке відставання, приблизно на дві доби, розвитку зародків через 5-9 діб після штучного запилення. У цей період у кліностауному варіанті виявлялась більша різноманітність зародків за розміром і ступенем розвитку сім'ядоль.

На стадії диференційованих зародків відмінності між варіантами найчастіше проявлялися у відставанні у кліностауному варіанті розвитку однієї із сім'ядоль або появи сім'ядоль аномальної форми (рис. 2, б), при цьому розмір самих зародків перевищував контрольні (рис. 2, а). Спостерігались також випадки неправильного згину або повної відсутності згину зародкового кореня «кліностаутованих» зародків (рис. 2, в). Інколи дослідні зародки були безбарвними, тоді як у контролі вони мали типове забарвлення зеленуватого кольору.

Отримані дані про порушення формування зародків в умовах кліностаування до певної міри збігаються із результатами раніше виконаних досліджень, де показано зниження майже на 50 % у порівнянні із контролем кількості сформованого насіння у рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. і *Chenopodium rubrum* L, які росли на повільних

горизонтальних кліноставах [3].

В цілому диференціювання зародків *Brassica rapa* в умовах кліностаування та в лабораторному контролі відбувається подібним чином. Проте відмічаються випадки порушень процесу диференціювання як зародкових коренів, так і сім'ядоль зародків, що може бути однією з причин зниження кількості та життєздатності насіння, сформованого в умовах зміненої гравітації.

1. Левинских М. А., Сычев В. Н., Дерендяева Т. А. и др. Анализ влияния космических факторов на рост и развитие суперкарликовой пшеницы в оранжерее «Свет» // Авиакосмич. и эколог. мед.—1999.—33.—С. 30—37.
2. Меркис А. И., Лауринавичюс Р. С. Полный цикл индивидуального развития растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. на борту орбитальной станции «Салют-7» // ДАН СССР.—1983.—271.—С. 509—512.
3. Меркис Ф. И., Лауринавичюс Р. С., Рупайнене О. Ю. и др. Рост и развитие растений в условиях, имитирующих невесомость // ДАН СССР.—1976.—226.—С. 978—981.
4. Bingham G. E., Sytchev V. N., Levinskikh M. A., Podolsky I. G. Final plant experiments on Mir provide second-generation wheat and seeds // Gravitat. and Space Biol. Bulletin.—1999.—13(1).—P. 48.
5. Eastmond P., Kolacna L., Rawsthorne S. Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.) // J. Experim. Bot.—1996.—47(304).—P. 763—1769.
6. Kuang A., Popova A., Xiao Y., Musgrave M. Pollination and embryo development in *Brassica rapa* L. in microgravity // Internat. J. of Plant Sci.—2000.—161(2).—P. 203—211.
7. Musgrave M. E., Kuang A., Xiao Y., et al. Gravity-independence of seed-to-seed cycling // Planta.—2000.—210.—P. 400—406.
8. Popova A., Musgrave M., Kuang A. and Xiao Yi. Reserve nutrient substance accumulation in *Brassica rapa* L. seeds in microgravity conditions (STS-87) // J. Gravitat. Physiol.—2002.—9.—N 1.—P. 237—238.

#### EMBRYO DEVELOPMENT IN BRASSICA RAPA L. PLANTS UNDER CLINOROTATION

A. F. Popova and G. F. Ivanenko

Our results of comparative study of embryo formation in *Brassica rapa* L. plants under slow horizontal clinorotation and in laboratory control are presented. The research is executed on embryos of identified age, which was achieved by the marking of flowers after artificial pollination and by the use of temporal fixation of the plant material. Successive stages of embryo development up to their full differentiation (3—21 days after artificial pollination) are investigated. A significant similarity of peculiarities and rates of embryo development at early stages of embryogenesis is revealed in both variants. As a whole, the differentiation process of embryos in conditions of slow horizontal clinorotation and in the laboratory control proceeded identically. However, some cases of disturbance in the cotyledons and radicle development of embryos, generated under altered gravity, are noted. Disturbances revealed in embryo differentiation can be a reason of decrease of quantity and viability of seeds generated under changed gravity.