

Г.І. МАРТИН, Л.І. МУСАТЕНКО

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

**УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛІТИН
ЗАРОДКА НАСІННЯ *ACER
SACCHARINUM* L. І *A. TATARICUM* L.,
ЩО ВІДРІЗНЯЮТЬСЯ
ЗА СТАНОМ СПОКОЮ**

Ключові слова: клен, насіння, спокій, запасні речовини, ультраструктура клітин

Насіння є важливим, а часто і єдиним способом збереження на Землі видо-вої різноманітності рослин та їх розмноження. Ця функція насіння зумовлена його здатністю переходити до стану спокою, виявляючи високу стійкість до дії зовнішніх факторів. Завдяки спокою у природі, переважно в ґрунті, формуються досить потужні запаси життєздатного насіння, котре певний час здатне прорости [14]. Спокій насіння може бути вимушеним, якщо він зумовлюється відсутністю необхідних для проростання умов. Передусім це волога, температура і відповідний газообмін. Коли насіння не проростає за умов, сприятливих для даного виду, або різко звужується діапазон умов, за яких воно може проростати, настає органічний спокій [7]. За класифікацією Ніколаєвої [9], є три типи органічного спокою — екзогенний, ендогенний і комбінований. Екзогенний спокій пов'язаний з фізичними і хімічними властивостями насінних покривів, які затримують проростання насіння. Ендогенний спокій спричинений специфічними морфоанатомічними і фізіологічними властивостями зародка. Комбінований спокій базується на поєднанні ендогенного й екзогенного.

Якщо екзогенний спокій можна пояснити властивостями насінних покривів, то клітинні механізми, які керують станом фізіологічного спокою, далеко не з'ясовані. Є думка, що цей тип спокою визначається співвідношенням стимулюючих та інгібуючих складових гормональної системи зародка [1]. За Ніколаєвою [8], він зумовлюється фізіологічним механізмом гальмування, суть якого полягає у зниженій ростовій активності зародка і недостатній газопроникності насінних покривів. Кан [2] дійшов висновку, що одним з найвірогідніших механізмів може бути опосередкована дія фітогормонів на рівні клітинних структур, передусім мембран. Останні, своєю чергою, спричинюють події, які індукують чи порушують стан спокою. Мета нашої роботи полягала у дослідженні особливостей субмікроскопічної організації клітин зародка на етапі дозрівання насіння двох видів кленів, яке суттєво відрізняється за типом і глибиною спокою.

© Г.І. МАРТИН, Л.І. МУСАТЕНКО, 2007

Матеріал і методи дослідження

Досліджували насіння кленів срібlistого (*A. saccharinum* L.) і татарського (*A. tataricum* L.), які зростають у парковій зоні м. Києва. Незважаючи на подібність умов зростання, насіння цих видів істотно відрізняється за типом і глибиною спокою. Насіння *A. saccharinum* — рекальцитрантного типу чутливе до висушування і має обмежений період спокою. Навіть при зберіганні у відповідних умовах період його життя не перевищує кількох тижнів [19]. Насіння *A. tataricum* — ортодоксального типу, зневоднюється до повітряно-сухого стану, переходить до глибокого фізіологічного спокою і здатне проростати лише після тривалої (близько 4-х місяців) холодної стратифікації [10]. Зразки для дослідження відбирали у період найінтенсивнішого росту зародкової осі та сім'ядолей (23 квітня — 15 травня — *A. saccharinum*, 8 червня — 7 липня — *A. tataricum*) і зрілого насіння. Досліджували структуру клітин запасуючої паренхіми сім'ядолей і корової паренхіми зародкової осі в ділянці гіпокотилля. Лінійні параметри насіння визначали за допомогою окуляр-мікрометра в мікроскопі МБС-1. Рівень оводненості вимірювали шляхом висушування зразків і виражали у відсотках до маси сирої речовини. Для дослідження субструктури клітин зародка матеріал фіксували у забуферених розчинах (рН 7,4) 5 %-го глутарового альдегіду та 1 %-го чотириокису осмію. Фіксований матеріал зневоднювали в етиловому спирті зростаючої концентрації і вмішували у суміш епоксидних смол. Ультратонкі зрізи готували за допомогою скляних ножів на ультрамікромомі LKB-3 і досліджували в електронному мікроскопі JEM 1200 EX.

Результати досліджень та їх обговорення

Acer saccharinum цвіте ще до розпускання листків — наприкінці березня — початку квітня. Насіння формується протягом 2-х місяців. Найінтенсивнішим ріст зародка є у першу половину ембріогенезу на стадії формування округлої форми, коли ще немає сім'ядолей (глобулярна стадія). У фазу росту рівень оводнення зародка сягає 85—90 %. У міру диференціювання і нагромадження запасних речовин вміст вологи в клітинах знижується і на час опадання крилаток становить 50—55 %. Зріле насіння без оплоддя має розмір 16 ± 2 мм. Середня висота клітин основної паренхіми зародкової осі становить 30 ± 4 мкм, сім'ядолей — 38 ± 6 мкм. Якщо свіжозібране насіння тримати в чашках Петрі за кімнатної температури, то через 2—3 доби більшість його проростає без додаткового зволоження [5].

Acer tataricum зацвітає у другій половині травня після розпускання листків. У процесі ембріогенезу спостерігається швидкий розвиток ендосперму, який у наступному періоді використовується для живлення зародка і відсутній у зрілому насінні. У фазу росту оводненість зародка становить майже 87 %. Його ріст завершується на початку серпня. В цей час середній розмір і маса насіння сягають, відповідно, 9 ± 1 мм і 55 ± 6 мг. Клітини основної паренхіми зародкової осі мають висоту 18 ± 2 мкм, сім'ядолей — 30 ± 4 мкм. У середині вересня

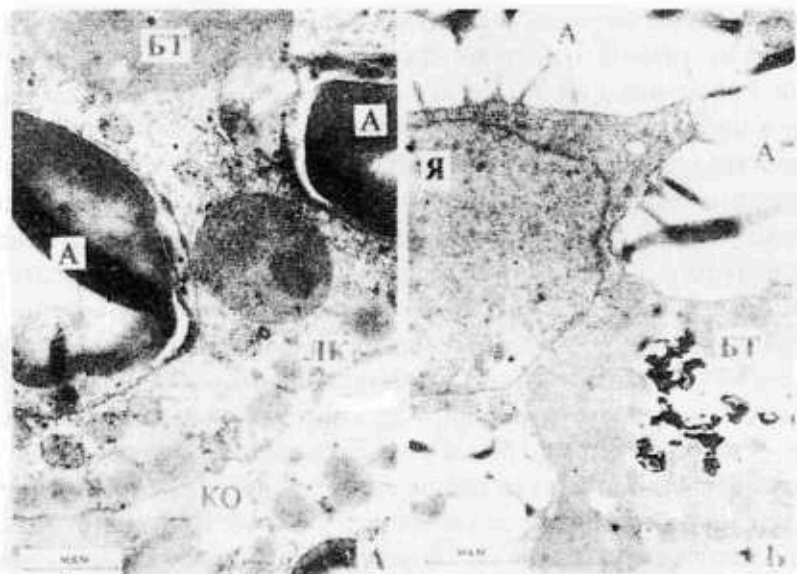


Рис. 1. Субмікроскопічна організація фрагментів клітин зародкової осі (А) і сім'ядолей (Б) зрілого насіння *Acer saccharinum* L. Позначення (тут і на рис. 2): Я — ядро, Ц — цитоплазма, А — амілопласт, БТ — білкове тіло, ЛК — ліпідна крапля, О — органела, КО — клітинна оболонка

Fig. 1. The fragments of the submicroscopical organization of the cells from embryo axis (A) and cotyledons (B) of *A. saccharinum* L. mature seeds. Abbreviations (here and on Fig. 2): Я — nucleus, Ц — cytoplasm, А — amyloplast, БТ — protein body, ЛК — lipid droplet, О — organelle, КО — cell wall

насіння досягає повної зрілості і переходить до стану глибокого фізіологічного спокою. Рівень вологи в цей період коливається у межах 12–14 %.

Показано, що клітини зародкової осі і сім'ядолей у період росту насіння клена срібlistого подібні за субструктурою. Вони містять численні вакуолі, сформовану сітку ендоплазматичного ретикулума, функціонально активні мітохондрії, пластиди і диктіосоми. Ядра характеризуються відносно гомогенною структурою матрикса і великими ядерцями, в клітинах інтенсивно синтезуються і нагромаджуються запасні речовини. Першими з'являються запасні ліпіди у вигляді ліпідних крапель розміром 0,6–0,8 мкм. Спостерігається фрагментація великих вакуолей на дрібніші, по периферії яких починає відкладатися запасний білок, внаслідок чого формуються білкові тіла. У більшості пластид з'являються крохмальні зерна. Синтез і нагромадження запасних речовин відбувається досить інтенсивно. Від 17 квітня до 21 травня добовий приріст маси сирої речовини насіння становить $8,5 \pm 0,7$ мг.

Клітини зародка зрілого насіння містять велику кількість запасних речовин (рис. 1, А, Б). Численні білкові тіла розміром до 10 мкм рівномірно розподілені в цитоплазмі. Ліпідні краплі переважно локалізовані вздовж плазмалем. Амілопласти включають великі крохмальні зерна. Ядра зберігають описану структуру, мають чітко виражену двомембранну оболонку. У мітохондрій типова для функціонально активного стану структура. У цито-

плазмі знаходяться численні елементи ендоплазматичного ретикулула у вигляді коротких каналів і цистерн. Диктіосоми не продукують секреторних пухирців. Рибосомальний комплекс представлений переважно вільно розміщеними в цитоплазмі моно- і полірибосомами.

Аналогічно клену срібlistому досліджено структуру клітин зародка клена татарського. У період формування ріст органів зародка відбувається за рахунок поділу клітин, їх ультраструктура практично не відрізняється від клітин клена срібlistого: вони мають тонкі оболонки, ядро у центрі, численні вакуолі, пластиди, мітохондрії, диктіосоми й елементи ендоплазматичного ретикулула. Плазмалема, тонопласт, мембрани органел чітко виражені та високо-контрастні. У міру формування насіння (червень—липень) дедалі більша кількість клітин зародка переходить до синтезу і нагромадження запасних речовин — запасних ліпідів і білків у вигляді ліпідних крапель і білкових тіл. Крохмаль виявляється лише на ранніх етапах, у пізніший період ембріогенезу не спостерігається. Кількість запасних речовин постійно збільшується, з часом вони заповнюють весь об'єм клітини, а цитоплазма набуває вигляду окремих острівців між ліпідними і білковими тілами (рис. 2).

У завершальний період формування і переходу насіння до глибокого фізіологічного спокою (кінець серпня — початок вересня), поряд зі зниженням рівня вологи, в цитоплазмі клітин відбуваються суттєві структурні зміни. Знижується осміофільність, спостерігається фрагментація мембран ендоплазматичного ретикулула і диктіосом, які в зрілому насінні відсутні. Мембрани ядерної оболонки, пластид і мітохондрій, а також плазмалема і тонопласт поступово втрачають контрастність, ламелярну структуру і зазнають таких кардинальних змін, що в зрілому насінні їх ідентифікувати практично неможливо (рис. 2, Б, В). Цитоплазматичний матрикс набуває досить високої осміофільності і вираженої гранулярної структури. Досить суттєво змінюється структура органел. Відповідна структурна перебудова мембран оболонки і матрикса у пластид і мітохондрій робить практично неможливою їх ідентифікацію (рис. 2, Г).

Отже, якщо на ранніх етапах розвитку клітини зародків насіння досліджуваних видів кленів досить близькі за будовою, то в подальшому виникають відміни, які поступово поглиблюються і досягають максимуму в зрілому насінні. Клітини зародка зрілого насіння клена срібlistого, поряд із нагромадженням значної кількості запасних речовин, зберігають усі структурні елементи цитоплазми. При цьому мембрани оболонки ядра, пластид, мітохондрій, диктіосом, ретикулула, а також плазмалема і тонопласт зберігають типову ламелярну структуру і високий контраст. Аналогічний ультраструктурний стан клітин зародка описано для рекальцитрантного насіння інших видів [3, 6, 12, 15, 16].

Завдяки високому вмісту вологи, функціональній активності клітин зародка і сприятливим умовам у рекальцитрантному насінні швидко змінюється напрямок метаболізму з нагромадження на використання запасних речовин

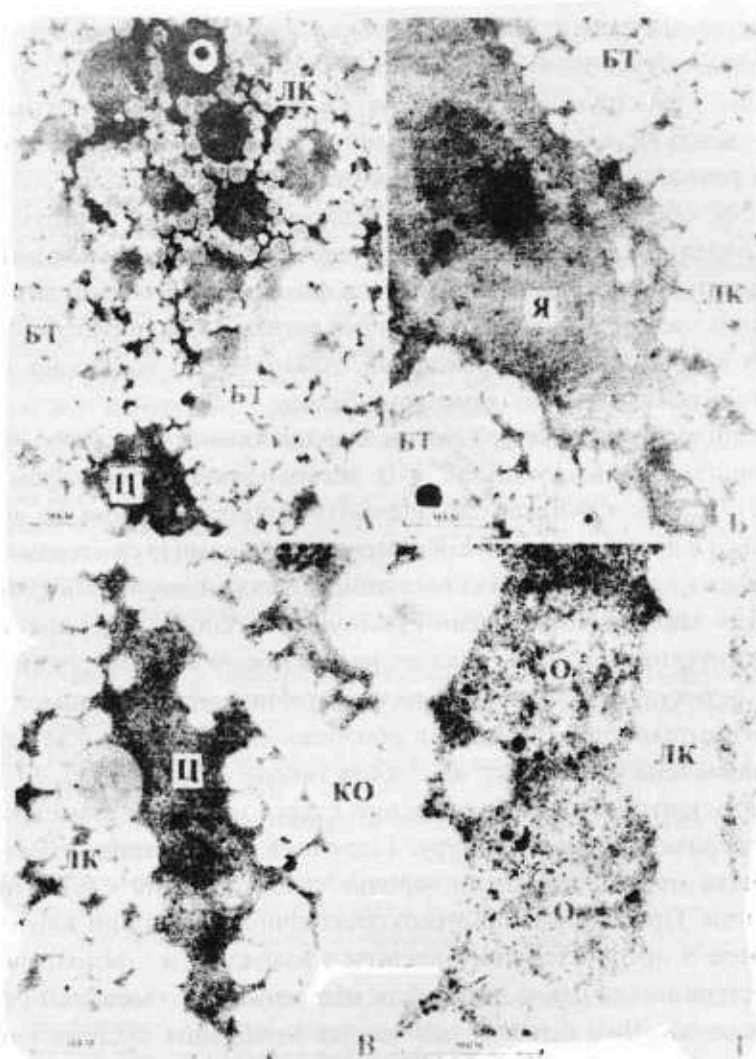


Рис. 2. Субмікроскопічна організація фрагментів клітин гіпокотила зародка зрілого насіння *A. tataricum* L.: А — загальний вигляд, Б — ядро, В — ділянка цитоплазми, Г — органели

Fig. 2. The fragments of the submicroscopical organization of *A. tataricum* L. mature seed embryo cells: А — general view of a cell, Б — nucleus, В — cytoplasm area, Г — organelles no identified

на ріст органів зародка [12, 14], тому період спокою (час зміни напрямку метаболізму) досить короткий. В окремих видів проростання починається вже на материнській рослині, ще до опадання насіння [12]. Відсутність чітких морфо-функціональних показників, які б свідчили про завершення розвитку рекальцитрантного насіння і початок його проростання, ускладнює визначення періоду спокою, що інколи трактується як його відсутність. Чутливість до висушування дає підставу припускати, що в рекальцитрантному насінні немає механізмів, які забезпечують стійкість зародка до зневоднення і його перехід до глибокого спокою.

Формування насіння клена татарського, на відміну від клена срібlistого, супроводжується зневодненням до повітряно-сухого стану і рядом характерних змін у субструктурі клітин зародка. Насамперед це відсутність запасного крохмалю як у клітинах сім'ядолей, так і зародкової осі. Основна маса запасних речовин представлена ліпідними і білковими тілами, які займають майже 80 % об'єму клітин зародка. Відбуваються зміни у структурі цитоплазми, передусім її мембранах. Починаючи з серпня, коли рівень води в насінні значно знижується, відбувається фрагментація з наступним повним зникненням елементів ендоплазматичного ретикулула і диктіосом. Мембрани оболонки ядра, пластид і мітохондрій, плазмалема і тонопласт поступово втрачають чіткість і типову ламелярну будову.

Описані зміни у структурі клітин зародка клена татарського, як і інших видів, пов'язані, найвірогідніше, з їх зневодненням і переходом до стану спокою [17]. Механізми, що забезпечують стійкість насіння до висихання, формуються в другій половині ембріогенезу, пов'язані із синтезом специфічної групи протекторних білків і поступовим зниженням метаболічної активності клітин зародка [13]. У насінні з вимушеним спокоєм дегідратація спричинює руйнування полісом, зникнення диктіосом і елементів ендоплазматичного ретикулула, розпад фотосинтезуючих мембран пластид, зміни морфології мітохондрій. Мембрани оболонки ядра, пластид і мітохондрій, а також плазмалема і тонопласт зберігають типову структуру [11, 18, 20]. Тобто більшість клітинних мембран зрілого сухого насіння у стані вимушеного спокою зберігає типову структуру. Гідратація і сприятливі умови швидко відновлюють метаболізм клітин зародка такого насіння і його перехід до проростання. При порівнянні субмікроскопічної організації клітин рекальцитрантного й ортодоксального насіння з вимушеним і фізіологічним спокоєм спостерігається певна залежність між структурою мембран і глибиною спокою зародка. Чим більших змін зазнає мембранна система клітин, тим глибший період спокою насіння. Виявлена залежність дає підставу говорити про можливий зв'язок між станом мембранної системи і типом та глибиною спокою. На можливу участь мембран у формуванні фізіологічного спокою насіння звертали увагу інші автори [4]. Однак прямі дані, які б розкривали механізми такої участі, на сьогодні відсутні. Детальніше дослідження цих процесів передусім передбачає необхідність визначити, якою мірою виявлені зміни субструктури клітин зародка клена татарського характерні для рослин інших видів, насіння яких перебуває у глибокому фізіологічному спокої. Крім того, важливо дослідити, які структурні зміни відбуваються у період холодної стратифікації, коли насіння виходить із спокою.

1. Далецкая Т.В. Температура стратификации и гормоны в покое и прорастании семян // Пробл. разв. семеноведения и семеновод. интродуцентов. — М.: Наука, 1984. — С. 38—44.
2. Кан А.А. Покой семян: смена концепций и теорий // Физиол. и биохим. покоя и прораст. семян. — М.: Колос, 1982. — С. 47—71.
3. Мартин Г.І. Стан ультраструктури клітин зародкової осі при втраті життєздатності насіння *Rorulus nigra* L. // Укр. ботан. журн. — 1990. — 47, № 6. — С. 49—53.
4. Мордерер Є.Ю., Гродзинський Д.М. Перекисне окислення ліпідів і регуляція стану органічного спокою насіння // Укр. ботан. журн. — 1988. — 45, № 6. — С. 84—90.
5. Мусатенко Л.І., Берестецький В.О., Веденічева Н.П., Генералова В.М., Мартин Г.І., Ситник К.М. Фітогормони і структура клітин зародка насіння *Acer saccharinum* L. // Укр. ботан. журн. — 1993. — 50, № 1. — С. 52—58.
6. Мусатенко Л.І., Генералова В.М., Мартин Г.І. До фізіології спокою насіння *Aesculus hippocastanum* L. // Укр. ботан. журн. — 1997. — 54, № 1. — С. 86—91.
7. Николаева М.Г. Физиология глубокого покоя семян. — Л.: Наука, 1967. — 206 с.
8. Николаева М.Г. Некоторые итоги изучения покоя семян // Ботан. журн. — 1977. — 62, № 9. — С. 1350—1368.
9. Николаева М.Г. Покой семян // Физиол. семян. — М.: Наука, 1982. — С. 125—183.
10. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. — Л.: Наука, 1985. — 348 с.
11. Ситник К.М., Мартин Г.І. Вплив зневоднення на ультраструктуру клітин і життєздатність насіння *Phaseolus vulgaris* L., що проростає // Укр. ботан. журн. — 1994. — 51, № 5. — С. 5—14.
12. Berjak P., Pammenter N.W., Vertucci Ch. Homoiohydrous (recalcitrant) seed: Developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer // Planta. — 1992. — 186, N 2. — P. 249—261.
13. Bewley J.D. Physiological aspects of desiccation tolerance — a retrospect // Int. J. Plant Sci. — 1995. — 156, N 4. — P. 393—403.
14. Bewley J.D., Black M. Seeds physiology of development and germination. — New York, London: Plenum Press, 1995. — 367 p.
15. Farrant J.M., Pammenter N.W., Berjak P. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation // Ann. Bot. — 1992. — 70, N 1. — P. 75—86.
16. Farrant J.M., Berjak P., Pammenter N.W. Studies on the development of the desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.: The acquisition of germinability and response to storage and dehydration // Ann. Bot. — 1993. — 71, N 5. — P. 405—410.
17. Klein S., Pollok B.M. Cell fine structure of developing lima bean seeds related to seed desiccation // Amer. J. Bot. — 1968. — 55, N 6. — P. 658—672.
18. Kuras M. Activation of rape (*Brassica napus* L.) embryo during seed germination. III. Ultrastructure of dry embryo axis // Acta. Soc. Bot. Polonia. — 1994. — 53, N 2. — P. 171—186.
19. Musatenko L.I., Berestetsky V.A., Vedenicheva N.P., Generalova V.N., Martyn G.I., Sytnik K.M. Phytohormones and structure of cells of *Acer saccharinum* seed embryo // Biol. Plantarum. — 1995. — 37, N 4. — P. 553—559.
20. Webster B.J., Leopold A.C. The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean // Amer. J. Bot. — 1977. — 64, N 10. — P. 1286—1293.

Рекомендує до друку
К.М. Ситник

Надійшла 23.05.2005

Г.И. Мартын, Л.И. Мусатенко

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК ЗАРОДЫША СЕМЯН
ACER SACCHARINUM L. И *A. TATARICUM* L.,
ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ГЛУБИНОЙ ПОКОЯ

Исследована ультраструктура клеток формирующихся и зрелых семян рекальцитрантного (*A. saccharinum* L.) и ортодоксального (*A. tataricum* L.) типов. Показано, что в ранний период эмбриогенеза клетки зародыша семян обоих видов имеют сходную ультраструктуру. Зрелые семена *A. saccharinum* характеризуются высоким уровнем оводненности (50–55 %), чувствительны к высушиванию и способны быстро прорастать без дополнительного увлажнения. Клетки их зародыша, наряду с запасными веществами (крахмал, белки, липиды), содержат органеллы, структура которых свидетельствует об их функциональной активности. Семена *A. tataricum* при созревании переходят в состояние глубокого физиологического покоя и способны прорасти после длительной холодной стратификации. Клетки зародыша полностью загружены запасными липидами и белками. Гиалоплазма и органеллы претерпевают существенные изменения, проявляющиеся в радикальной перестройке структуры клеточных мембран, в результате чего затрудняется их идентификация. Высказано предположение о наличии коррелятивной зависимости между глубиной покоя семян и состоянием мембранной системы клеток зародыша.

Ключевые слова: клен, семена, покой, запасные вещества, ультраструктура клеток

G.I. Martyn, L.I. Musatenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THE ULTRASTRUCTURE OF *ACER SACCHARINUM* L.
AND *A. TATARICUM* L. SEED EMBRYO
CELLS DIFFERING BY THE QUIESCENCE DEPTH

The ultrastructure of cells in the forming and mature seeds from the recalcitrant (*A. saccharinum* L.) and orthodox (*A. tataricum* L.) types was investigated. It was shown that the embryo cells of the seeds of both types had the similar ultrastructure in the early period of embryo genesis. The mature seeds of *A. saccharinum* were characterized with the high level of wateriness (50–55 %), sensitive to the insiccation, and capable to germinate quickly without additional watering. The embryo cells of such seeds had both organelles, whose structure testified about their functional activity, and the storage substances (starch, proteins, and lipids). During maturation, *A. tataricum* seeds turned into the state of deep physiological quiescence and were capable to germinate after the long cold stratification. The embryo cells were loaded totally with storage lipids and proteins. Hyaloplasm and organelles underwent substantial changes appearing in the drastic rearrangement of the cell membrane structure resulting in the difficulties of their identification. It was proposed that there was the correlative dependence between the seed quiescence depth and the state of the membrane system of the embryo cells.

Key words: maple, seed, dormancy, reserve substances, cell ultrastructure