ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГЛАВНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД ИМ. Н.В. ЦИЦИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Bland

Коваль Владимир Анатольевич

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ *COELOGYNE* LINDL. (ORCHIDACEAE JUSS.) В ОРАНЖЕРЕЙНОЙ КУЛЬТУРЕ

1.5.9. – Ботаника

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории тропических растений Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина Российской академии наук.

Научный руководитель:

Коломейцева Галина Леонидовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории тропических растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Сухоруков Александр Петрович, доктор биологических научный наук, ведущий кафедра высших растений сотрудник биологического факультета Московского государственного университета M.B. им. Ломоносова

Широков Александр Игоревич, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и зоологии ИБМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Ведущая организация:

Российский государственный аграрный университет – MCXA им. К.А. Тимирязева

Защита состоится ______ 2023 г. на заседании диссертационного совета 24.1.022.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук» (ГБС РАН) по адресу: 127279, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4, конференц-зал. Факс: 8-499-977-91-72.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБС РАН и на сайте www.gbsad.ru.

Автореферат разослан «___» ____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



А.С. Рябченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Orchidaceae Juss. является одним из самых крупных семейств цветковых растений (более 28000 видов из 736 родов) (Chase et al., 2015; Christenhusz, Byng, 2016). В особом строении цветков и соцветий, редукции отдельных стадий эмбриогенеза, протосомообразовании и других аспектах репродуктивной биологии отражены сложные биотические связи орхидных (энтомофилия, микосимбиотрофизм, эпифитизм) (Pridgeon et al., 1999). Многие виды орхидей находятся под угрозой вымирания из-за разрыва этих связей, в нарушенной человеком среде обитания, а также из-за неконтролируемого сбора декоративных и лекарственных видов (Lavarack et al., 2000). Среди способов охраны орхидных – разработка методов их культивирования ex situ и массового размножения in vitro (Nikishina et al., 2001; Shiau et al., 2002; Nalawade et al., 2003; Basker, Bai, 2006; Pant et al., 2008; Hossain et al., 2013; Deswiniyanti, Lestari, 2015; Lestari, 2015; Astarini et al., 2017). Потенциал практического использования декоративных лекарственных представителей семейства орхидных еще далеко не исчерпан, особенно это касается мало изученных эпифитных тропических видов, в том числе, из рода Coelogyne Lindl.

Наименее изученным аспектом в теории интродукции растений является репродуктивный барьер (Виноградова и др., 2020), связанный с образованием семян и особенностями развития плода. В данном исследовании род *Coelogyne* стал модельным объектом для изучения критических этапов репродукции орхидей в оранжерейной культуре, таких как цветение, опыление, оплодотворение и диссеминация. Литературные данные по фенологии, морфологии соцветий, особенностям опыления, развитию семязачатков, эмбриогенезу и образованию плодов *Coelogyne* фрагментарны либо полностью отсутствуют.

Целью настоящей работы стало выявление особенностей развития и строения репродуктивных структур представителей рода *Coelogyne* и определение критических этапов репродукции.

Задачи:

- 1. Оценить эффективность прохождения критических этапов репродукции *Coelogyne* в условиях оранжерейного культивирования при получении семенного материала;
- 2. Сопоставить фенологию цветения *in situ* и *ex situ*, установить эффективность автогамного, гейтоногамного и ксеногамного опыления;
- 3. Выявить структурно-ритмологические типы соцветий (односезонное, интеркалярное, всесезонное);
- 4. Описать особенности развития семязачатка, мегаспорогенеза и мегагаметогенеза;

- 5. Выявить особенности эмбриогенеза, в том числе, структуры и роста суспензора;
- 6. Проанализировать структуру плодов, выявить особенности их вскрывания и сроки полного созревания.

Научная новизна. Настоящая работа является первым комплексным исследованием репродуктивной биологии орхидей на этапах цветения, опыления, оплодотворения и диссеминации. Проведена оценка критических этапов репродукции *Coelogyne* в оранжерейной культуре. Описан новый структурно-ритмологический ТИП соцветия всесезонное (непрерывно нарастающий открытый брактеозный колос). Впервые в роде Coelogyne выявлен коловантный тип образования соцветия с чередующимися фертильными и стерильными побегами. Впервые изучен полный цикл образования семязачатка, зародышевого мешка и зародыша *Coelogyne*, выявлены элементы редукции некоторых стадий, показано отсутствие двойного оплодотворения, описаны 3 варианта объединения полярных ядер и спермия, обнаружено партенокарпическое развитие плодов неоплодотворенными яйцеклетками. Впервые в зародышевых мешках Coelogyne выявлена лабильность числа ядер от 4 до 8, сохранение синергид при оплодотворении вплоть до стадии многоклеточного зародыша; у выявлено образование многоклеточного зародыша суспензора интеркалярным ростом и интраовулярным расположением, отсутствие деления клетки cb (базальной клетки двуклеточного зародыша) на всем протяжении эмбриогенеза, у суспензора впервые выявлено образование особых придаточных клеток-крючков. На основании этих признаков в семействе орхидных описан новый тип эмбриогенеза – Coelogyne-тип. Описан новый морфогенетический тип плода с одревесневающей эпидермой эпикарпия и выявлен механизм его вскрывания.

Теоретическая И практическая значимость. Работа теоретический и прикладной характер, ее результаты вносят существенный вклад в теорию интродукции, биоморфологию, эмбриологию и карпологию орхидных, в том числе, *Coelogyne*. Для управления технологическими операциями получения качественного семенного материала от оранжерейных орхидных проведена оценка последовательных этапов репродукции, выявлены 2 наиболее критических этапа – опыление и оплодотворение. У представителей рода Coelogyne выявлен высокий самонесовместимости, показано, что для получения полноценных семян необходимо ксеногамное опыление между разными клонами. Выявление нового типа эмбриогенеза с интраовулярным нитевидным многоклеточным суспензором нового морфогенетического типа коробочки И

одревесневающим эпикарпием вносит вклад в соответствующие разделы ботаники. Проведенное исследование имеет практическое значение при культивировании орхидей *ex situ*, в том числе для оптимизации семенного размножения *in vitro*, криосохранения и непрямого соматического эмбриогенеза. Полученные данные могут быть использованы для чтения вузовских курсов по морфологии, эмбриологии и карпологии растений.

Положения, выносимые на защиту:

- 1. Новый для орхидных тип эмбриогенеза Coelogyne-тип характеризуется морфологическим сходством с зародышем Orchideae-типа, но существенно отличается от него генезисом, строением и интраовулярным расположением суспензора.
- 2. Плоды *Coelogyne* являются нижними трехмерными паракарпными коробочками. Эпидерма эпикарпия и 2–3 периферических слоя основной ткани эпикарпия представлены лигнифицированными клетками. Такой тип плода ранее не был описан для покрытосеменных. Это является поводом установления нового морфогенетического типа плода коробочка Coelogyneтипа.

Апробация результатов. Результаты доложены на 3 международных и российских конференциях: XII Международной научной конференции «Охрана и культивирование орхидей» (Москва, 7–10 июня 2022 г.); Международной научной конференции «Биоморфология растений: традиции и современность» (Киров, 19–21 октября 2022 г.); XXIV Международной научной конференции «Биологическое разнообразие Кавказа и Юга России» (Магас, 17–20 ноября 2022 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ, из них 2 статьи, включённые в международную реферативную базу данных Scopus.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 241 странице машинописного текста, содержит 89 рисунков и 28 таблиц. Список литературы включает 218 источников, в том числе 184 иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.б.н. Г.Л. Коломейцевой за ценные консультации, помощь, разностороннюю поддержку и неизменно внимательное наставничество на всех этапах работы, без её поддержки и помощи эта работа не была бы написана. Также автор считает своим приятным долгом выразить признательность и поблагодарить за ценные методические советы д.б.н. А.В. Бабоше и профессору РАН, д.б.н. А.В. Боброву (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова). Автор также искренне благодарит за

важные и необходимые замечания к.б.н. М.С. Романова. Автор признателен за ценные методические советы и помощь в обработке данных к.б.н. А.С. Рябченко. За методическую помощь в визуализации результатов и всестороннюю поддержку при проведении исследования благодарен Н.С. Здравчеву. Сердечно благодарю свою супругу за понимание, заботу, терпение и поддержку в ходе выполнения работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Общая характеристика рода *Coelogyne*

Приведён краткий обзор систематического положения (Lindley, 1821, 1854; Reichenbach, 1861; Pfitzer, Kraenzlin, 1907; Comber, 1990; Butzin, 1992; Gravendeel, de Vogel, 1999; Clayton, 2002; Gravendeel et al., 2001; 2005; Van den Berg, 2005; Chase et al., 2015, 2021), местообитания (Pradhan, 1979; de Vogel, 1992; Clayton, 2002; Averyanov et al., 2016) и практического значения (Erfcamp, Grub, 1996; Manandhar, 2002; Thakur et al., 2010; Gutiérrez, 2010; Pant, 2013; Teoh, 2016; Wati et al., 2021) представителей рода *Coelogyne*.

Глава 2. Материалы и методы

Объектами исследования послужили 38 видов *Coelogyne* из 15 секций, представленные в коллекции Фондовой оранжереи ГБС РАН (рис. 1).

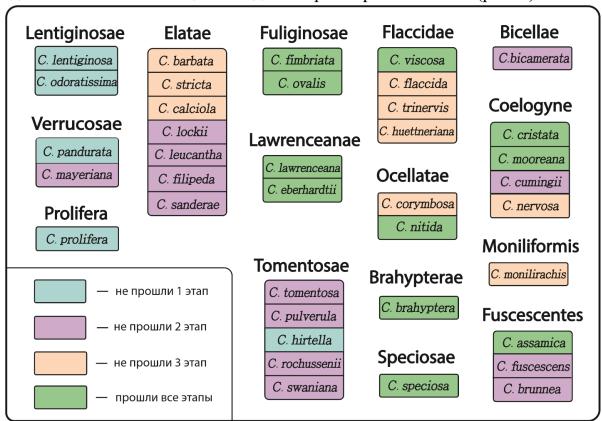


Рисунок 1. Схема секционного деления *Coelogyne* (38 таксонов из 15 секций) и оценка прохождения четырех этапов репродукции.

Фенологические наблюдения проводили с помощью стандартных методов. Искусственное опыление проводили автогамным (самоопыление), гейтоногамным (между цветками одного растения) и ксеногамным способами (между разными клонами). Всего было проведено 2573 опыления, получено 740 плодов. Для оценки эффективности опыления каждым перечисленным выше способом проводили попарные сравнения с помощью программы PAST (Paleontological Statistics). Для эмбриологических исследований плоды 8 видов Coelogyne разной степени зрелости фиксировали в 2% параформальдегиде на 0,05 М фосфатном буфере рН 7.4. Семязачатки окрашивали смесью водных растворов калькофлуора и пропидиум йодида (СF+PI), чистым пропидиум йодидом (PI), а также берберином (BRB), отмывали и помещали в 50%-ный глицерин. Препараты просматривали на конфокальном лазерном микроскопе Olympus FV 1000D при возбуждении фиолетовым лазером 405 нм или с дополнительным освещением лазерами 473 и 560 нм. Для получения эмбриологических фото высокого качества с расширенной глубиной резкости исходные фото были объединены в стеки с помощью программ Imaris Viewer и Helicon Focus. Для карпологических исследований плоды 8 видов Coelogyne были собраны на трех стадиях развития и зафиксированы в 70 %-м растворе этанола. Изготовление анатомических срезов производили с помощью стандартных методов. Постоянные препараты изучали с помощью светового микроскопа Olympus CX41. Фотографии препаратов изготовляли с помощью зеркальной цифровой камеры Canon EOS 7D. Для получения анатомического фото высокого качества с расширенной глубиной резкости исходные фото были объединены в стеки и панорамы с помощью программ Adobe Photoshop СС или Helicon Focus.

Глава 3. Первый этап репродукции – цветение

Фенологические наблюдения, проведенные для разных видов в течение 4 лет, показали, что в условиях интродукции у Coelogyne проявляются разнообразные спектры цветения, носящие видоспецифический характер. На этапе цветения спектр волнообразно-устойчивого цветения, при котором запаздывающее цветение чередовалось с опережающим цветением и при этом развития незначительно отличалось OT фаз соцветий природе, продемонстрировали всего четыре вида – C. assamica Linden et Rchb.f., C. brachyptera Rchb.f., C. trinervis Lindl., C. viscosa Rchb.f.. Цветение остальных видов отклонялось от природного ритма в ту или другую сторону. При выращивании в оранжерее сохранили природные ритмы двукратного цветения - C. barbata Griff., C. brunnea Lindl., C. eberhardtii Gagnep., C. huettneriana Rchb.f.. A однократно цветущая в природе C. lawrenceana Rolfe в оранжерее стала цвести два раза в год. *C. nitida* (Wall.mss) Lindl., в природе обычно цветущая осенью, в культуре стала развивать соцветия в зимне-весенний период.

разнообразие вегетативной Показано взаимного развития генеративной частей вегетативно-генеративного побега, у разных видов Coelogyne: протерантный (генеративно опережающий), синантный (одновременный), гистерантный (вегетативно опережающий), гетерантный (боковой), коловантный (чередование стерильных и фертильных побегов). Образование редкого коловантного типа соцветий обнаружено у *C. cristata* var. hololeuca Rchb.f. Выявлено, что в основном секционное деление коррелирует с типом развития соцветий, но в секциях Coelogyne, Flaccidae, Lentiginosae, Ocellatae имеются виды с разными типами развития соцветий.

В роде *Coelogyne* выявлено три структурно-ритмологических типа соцветий – односезонные соцветия (большинство экспериментальных видов), соцветия с интеркалярным цветорасположением (*C. prolifera* Lindl.), всесезонные соцветия (*C. monilirachis* Carr.). Всесезонное соцветие *С. monilirachis* является открытым брактеозным колосом, с непрерывным многолетним нарастанием (в нашем случае – более 5 лет), постоянным образованием бутонов, но формированием полноценных цветков происходит только при увеличении длины дня (с марта по июнь).

Глава 4. Второй этап репродукции – опыление

Опыление. Второй этап репродукции успешно прошли 20 видов из 10 секций. При опылении мы наблюдали 3 варианта образования плодов Coelogyne: нормально развитых плодов с полноценными семенами, плодов с семенами без зародыша и партенокарпических плодов без семязачатков. В природных популяциях другие авторы также отмечали проблемы с получением полноценных плодов. Например, в полевых опытах по искусственному опылению C. flaccida и C. nitida в Непале, ни один цветок не гейтоногамном скрещивании. Было завязал плодов при высказано предположение, что эти виды являются строго перекрестноопыляемыми (Subedi, 2011). По данным Cheng et al. (2009), в природных местах обитания C. fimbriata Lindl. также проявляет строгую самонесовместимость. Другие опыты по контролируемому скрещиванию Coelogyne в природных местах обитания не проводились.

В оранжерейных условиях нами также показан высокий уровень самонесовместимости *Coelogyne* в пределах одного клона. При искусственном опылении автогамным (в пределах одного цветка) и гейтоногамным (между

цветками одного образца или цветками одного клона) способами достоверные различия в пользу опыления гейтоногамным способом выявлены у 4 видов (С. cristata Lindl., C. mooreana Rolfe, C. lawrenceana Rolfe, C. ovalis Lindl.). Y остальных экспериментальных видов, представленных в коллекции всего одним клоном, оба способа переноса пыльцы имели одинаково низкую эффективность. Виды, представленные в коллекции единственным образцом и не завязавшие ни одного плода при автогамном опылении: C. bicamerata J.J.Sm., C. cristata var. hololeuca, C. cumingii Lindl., C. filipeda Gagnep., C. leucantha W.W.Smith, C. lockii Aver, C. sanderae Kraenzl. ex O'Brien, C. brunnea, C. fuscescens Lindl., C. lentiginose Lindl., C. corymbose Lindl., C. mayeriana Rchb.f. Ни одного плода при гейтоногамном опылении между разными образцами одного клона не завязали виды из секции Tomentosae (C. pulverula Teijsm. & Binn., C. rochussenii De Vriese, C. tomentosa Lindl.). Автогамным способом опыления также не удалось получить плоды от C. flaccida, C. huettneriana. *C*. lawrenceana, C. nitida, *C*. trinervis. Максимальная эффективность ксеногамного опыления (между цветками разных клонов) выявлена у С. mooreana (76 %), С. speciosa subsp. fimbriata (J.J.Sm.) Gravendeel (74 %), C. cristata (72 %), C. assamica (64 %) (рис.2).

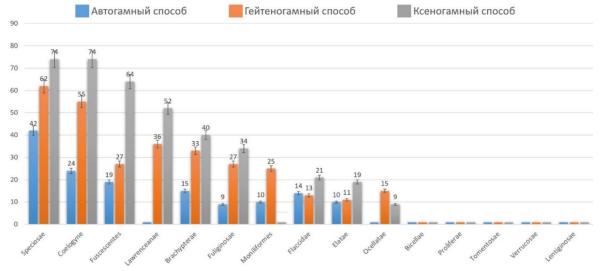


Рисунок 2. Эффективность автогамного, гейтоногамного и ксеногамного опыления (%) у *Coelogyne* из 15 секций (по числу завязавшихся плодов).

У всех видов завязавшиеся плоды были получены ксеногамным способом опыления, за исключением С. *speciosa* subsp. *fimbriata*, от единственного вегетативно размноженного клона которой удалось получить плоды гейтоногамным способом.

Мегаспорогенез и мегагаметогенез у разных видов орхидных, в том числе у *Coelogyne*, имеет общие черты редукции, такие как преобразование археспориальной клетки в материнскую клетку мегаспор без дополнительных

делений, образование зародышевых мешков с неполным набором ядер, отсутствие эндосперма и др. (Поддубная-Арнольди, 1958, 1976; Шамров, 2008; Kolomeitseva et al., 2023). Мегаспорогенез *Coelogyne* характеризуется отсутствием второго деления мейоза в микропилярной диаде и образованием не тетрады, а триады мегаспор.

Исследование мегагаметогенеза видов *Coelogyne* из 4 секций выявило разный уровень редукции митотических делений в микропилярном и халазальном концах зародышевого мешка и лабильность числа ядер от 8 (*C. speciosa* subsp. *fimbriata*, секция *Speciosae* и *C. fimbriata*, секция *Fuliginosae*) до 6 (*C. lawrenceana*, секция *Lawrenceanae*), 5 (*C. mooreana*, секция *Coelogyne*) и даже до 4 (у *C. cristata*, секция *Coelogyne*). Были выявлены следующие особенности образования женского гаметофита: зародышевый мешок моноспорический, Polygonum-типа; лабильность числа ядер в зародышевых мешках экспериментальных видов – от 4 до 8; вариативность распределения ядер в зародышевых мешках: 4+4, 4+2, 3+3, 3+2, 2+2 (рис. 3).

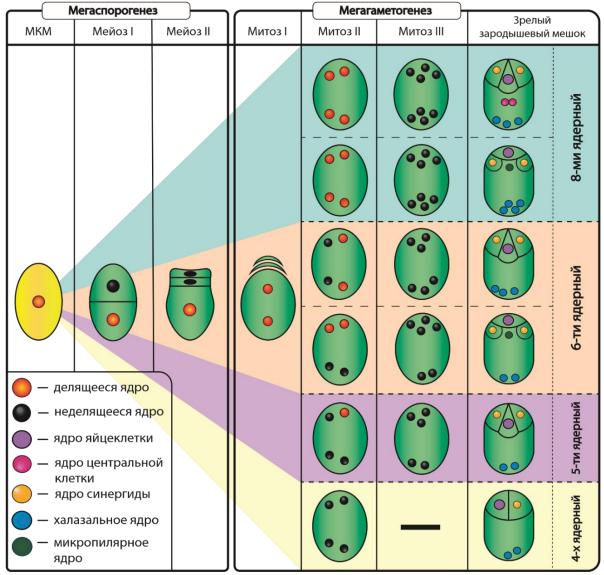


Рисунок 3. Диаграмма вариантов мегаспорогенеза и мегагаметогенеза у *Coelogyne*.

Глава 5. Третий этап репродукции – оплодотворение и эмбриогенез

У разных видов *Coelogyne* от момента опыления до оплодотворения проходит от 4 до 5 месяцев. Успешное оплодотворение наблюдали у 11 видов *Coelogyne* из 8 секций.

Самое первое упоминание о строении зародыша *Coelogyne* встречается в работе Swamy (1942), где имеется рисунок с удлиненным одноклеточным суспензором *C. breviscapa* Lindl. (рис. 4A). Наши исследования не подтвердили наличие одноклеточного суспензора у *Coelogyne*, наоборот, у этого рода был обнаружен очень длинный многоклеточный суспензор (рис. 5В). Особый интерес и ценность для нас представляют две работы Veyret (1965, 1974), в которых показана не только структура зрелого зародыша *C. parishii* Hook.f., но приведены рисунки порядка деления клеток на ранних стадиях эмбриогенеза, в том числе деление базальной клетки *cb* (рис. 4Б).

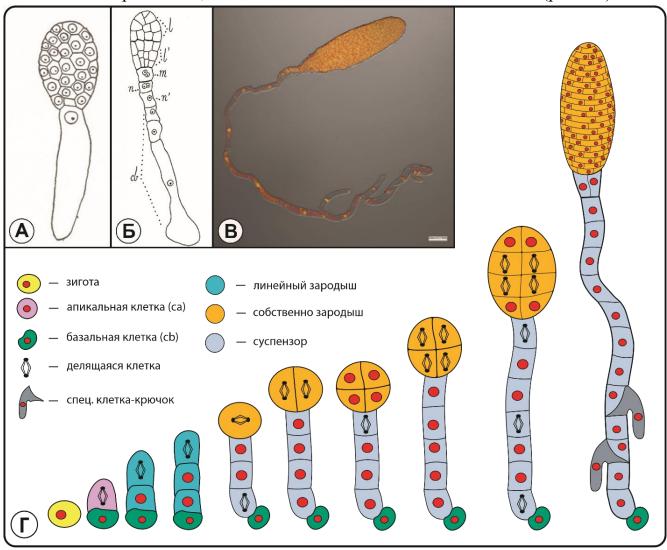


Рисунок 4. Строение зародышей *Coelogyne*. А – *C. breviscapa* (Swamy, 1942); Б – *C. parishii* (Veyret, 1965); В – микрофотография зародыша *C. speciosa* subsp. *fimbriata* (конфокальная лазерная микроскопия); Γ – схема деления клеток зародыша *C. speciosa* subsp. *fimbriata*. Масштабная линейка: В = 20 μ m.

Нашими исследованиями показано отсутствие деления клетки cb на всем эмбриогенеза Coelogyne. Выявлено необычное расположение яйцеклетки и синергид в зародышевом мешке, при котором синергиды расположены ближе к центру зародышевого мешка по сравнению с яйцеклеткой. При оплодотворении ядра синергид (или ядро единственной синергиды) не разрушаются содержимым пыльцевой трубки, они длительное время сохраняются, соприкасаясь только с клетками суспензора, но не с другими ядрами зародышевого мешка (рис. 5). У зародыша выявлено образование многоклеточного нитевидного суспензора, у разных видов количество клеток варьирует от 14 до 25 (рис. 4Γ). У суспензора выделено три зоны интеркалярного роста (субапикальная, медиальная и суббазальная). Впервые в составе нитевидного суспензора выявлено образование особых придаточных клеток-крючков. Несмотря на морфологическое сходство зародышей Coelogyne с типом II эмбриогенеза по классификации Swamy (1949) и Orchideae-типом по классификации Clements (1999), самым существенным отличием эмбриогенеза этого рода является интраовулярность зародыша, то есть отсутствие выхода кончика суспензора за пределы зародышевого мешка и семязачатка и, соответственно, отсутствие его внедрения в стенку плаценты. Еще одной отличительной особенностью без правильная вытянутая форма базальной гаусториальных отростков, характерных для суспензора Orchideae-типа.

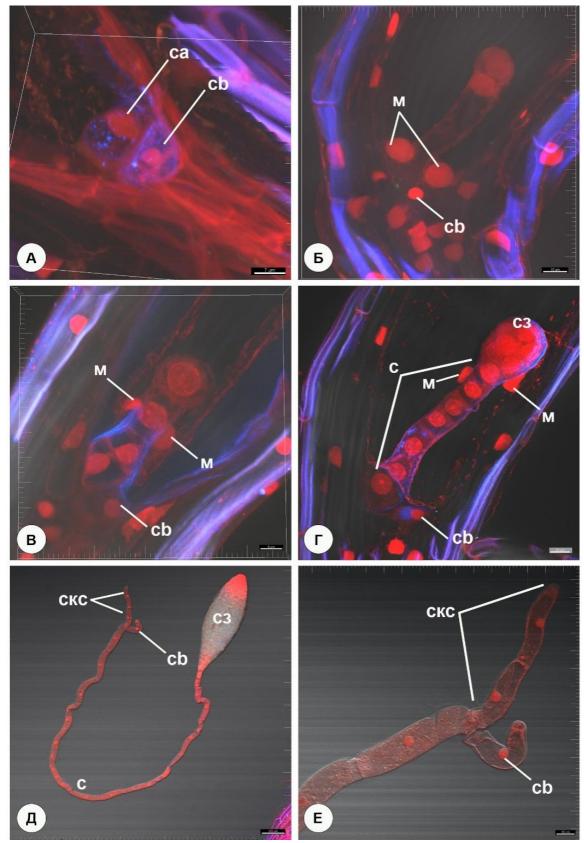


Рисунок 5. Эмбриогенез *C. speciosa* subsp. *fimbriata* (конфокальная лазерная микроскопия). А - 2-клеточный зародыш; Б - 3-клеточный зародыш; В - 5-клеточный зародыш; Г - 16-клеточный зародыш; Д - зрелый зародыш; Е - базальная часть суспензора, крупный план от Д. Сокращения: са - клетка ca, сb - клетка cb, сз - собственно зародыш, с - суспензор, скс - специальная клетка-крючок, м - микропилярное ядро. Масштабные линейки: А = 7 μ m; Б, $\Gamma =$ 10 μ m; В = 7 μ m; Д = 100 μ m; Е = 20 μ m.

Иногда периклинальные деления клеток в суббазальной зоне суспензора могут инициировать монозиготическую суспензоральную полиэмбрионию с образованием дополнительного полового зародыша. Этот факт подтверждает гипотезу о том, что такая эмбриональная структура как суспензор, не только снабжает собственно зародыш питательными веществами, но и может функционировать как банк эмбриогенных клеток.

Глава 6. Четвертый этап репродукции – образование плода и диссеминация

Четвертый этап репродукции (диссеминация) связан с особенностями формирования структуры и вскрывания стенок плода *Coelogyne*. Обычно от опыления до диссеминации проходит от полутора до двух лет и более. В некоторых случаях нормально развивающиеся плоды не имели семян. В работе показано, что различить нормально развитые и партенокарпические плоды можно уже на очень ранних стадиях, начиная со стадии заложения семязачатков на плаценте, а различить нормальные и неполноценные плоды с семенами без зародышей можно только на стадии образования зародышевого мешка и оплодотворения. У разных видов *Coelogyne* сроки образования женского гаметофита и оплодотворения видоспецифичны, поэтому раннее выявление неполноценных и партенокарпических плодов должно опираться на эмбриологические и карпологические исследования.

Нами выявлено, что плод *Coelogyne* – нижняя многосемянная коробочка, развивающаяся из трехкарпелльного одногнездного паракарпного гинецея и вскрывающаяся ламинально шестью неравными створками. эллипсоидные, довольно крупные, длиной от 2–3 см до 10–13 см, диаметром от 0.8–1 до 3,5–4.5 см; неравноребристые, клювовидные из-за сохраняющегося после опыления гиностемия. К дорзальной части каждой карпеллы прирастает чашелистик, а к вентральным частям соседних карпелл, несущих по одной краевой плаценте от каждой, прирастает лепесток. Таким образом, стенка плода в дорзальной части карпеллы представлена тканями чашелистика (эпикарпия) и тканями карпеллы (перикарпия), а в вентральных частях – тканями лепестка (эпикарпия) и тканями карпеллы (перикарпия). Условная граница срастания карпеллярных и экстракарпеллярных тканей у *Coelogyne* в пучком, дорзальной части карпелл проходит между проводящим васкуляризирующим чашелистик, и дорзальным проводящим карпеллы, снабжающим рыльце гиностемия, а граница между тканями частей соседних карпелл и лепестка определена между вентральных васкуляризирующим лепесток, и проводящим пучком, вентральными проводящими пучками соседних карпелл (рис. 6А).

Плацентация париетальная, плацента является структурой, возникшей путем пролиферации краевой части каждой из карпелл; плаценты интрузивные, свободные или сросшиеся (двураздельные в дистальной части).

У исследованных видов *Coelogyne* плоды вскрываются ламинально шестью неравными створками, в дорзальной части каждой карпеллы формируются щели вскрывания по обе стороны от дорзальных пучков карпелл, образуя сначала три створки, каждая из которых объединяет два структурных элемента плода, одну широкую створку (с плацентой) и одну узкую створку (без плаценты), затем разрыв происходит и между ними, формируя шесть створок, три широких и три узких (рис. 6Б). Отслоение клеток в зоне вскрывания и образование щели обеспечено ослаблением клеточной адгезии и нарастающим механическим напряжением в окружающих тканях, связанным с изменением тургора в процессе созревания плодов.

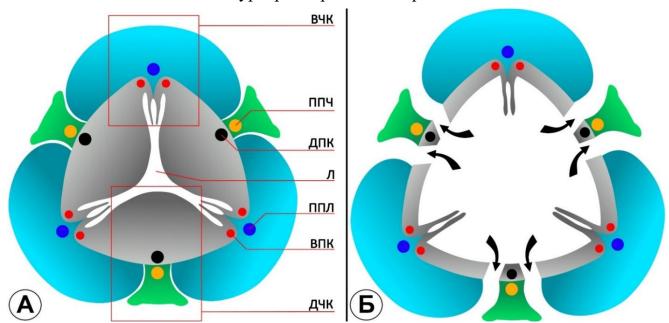


Рисунок 6. Схемы строения завязи (А) и зрелого плода (Б) *Coelogyne*. А – схема завязи, серый цвет – карпеллы (карпеллярная ткань), синий цвет – ткани лепестка (экстракарпеллярная ткань), зеленый цвет – ткани чашелистика (экстракарпеллярная ткань); Б – схема зрелого (вскрывшегося) плода, черные стрелки – щели вскрывания. Сокращения: вчк – вентральная часть двух соседних карпелл (топографическая зона стенки плода), ппч – проводящий пучок чашелистика, дпк – дорзальный пучок карпеллы, л – локула, ппл – проводящий пучок лепестка, впк – вентральный пучок карпеллы, дчк – дорзальная часть карпеллы (топографическая зона стенки плода).

Полученные нами данные о гистологических преобразованиях в процессе развития стенки плода *Coelogyne* позволили определить непрерывную зону склеренхимы в эпидерме и в 2–4 клеточных слоях периферической зоны основной ткани эпикарпия (рис. 7).

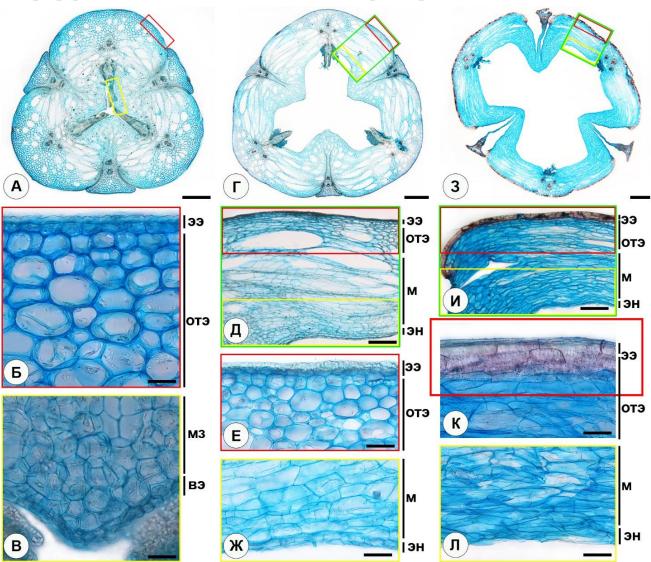


Рисунок 7. Анатомия стенки плода *C. nitida*. А-В, стадия 1 (завязь); Г-Ж, стадия 2 (незрелый плод, 2,5 МПО); 3-Л, стадия 3 (зрелый плод, 19,5 МПО). А – завязь. Б – внешняя часть стенки завязи (А), В – внутренняя часть стенки завязи, крупный план (А). Г – незрелый плод. Д – гистология стенки плода, крупный план (Г) (латеральная часть). Е – внешняя часть стенки плода, крупный план (Д). З – зрелый плод. И – гистология стенки плода (латеральная часть), крупный план (З). К – внешняя часть стенки плода, крупный план (И). Л – внутренняя часть стенки плода, крупный план (И). Сокращения: ээ – эпидерма эпикарпия, отэ – основная ткань эпикарпия, мз – мезофилл, вэ – внутренняя эпидерма карпеллы, м – мезокарпий, эн – эндокарпий, МПО – месяцев после опыления. Масштабные линейки: А = 200 μm; Б = 20 μm; В = 20 μm; Γ = 250 μm; Д = 70 μm; E = 50 μm; Ж = 50 μm; З = 150 μm; И = 70 μm; К = 50 μm; Л = 50.

Подобная стратегия накопления лигнина в клетках эпидермы эпикарпия и основной ткани эпикарпия ранее не была описана для покрытосеменных. В связи с этим мы предлагаем установить новый морфогенетический тип плода – коробочка Coelogyne-типа. Также нами предложена гипотетическая схема морфогенеза коробочек покрытосеменных на основании новых данных, полученных в результате карпологических исследований плодов *Coelogyne* (рис. 8).

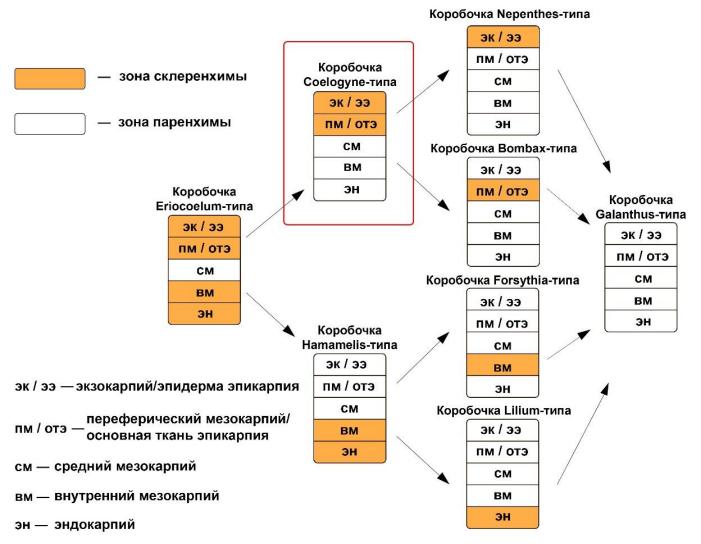


Рисунок 8. Схема морфогенеза коробочек покрытосеменных растений и гипотетическое место коробочки Coelogyne-типа.

У большинства исследованных видов *Coelogyne* нормально развитый плод вскрывается не ранее чем через 18 месяцев после опыления, при этом зоны вскрывания створок плода (слои специфических мелких клеток) формируются и хорошо различимы уже на стадии неопыленной завязи.

Заключение

В условиях оранжерейного культивирования каждый из последовательных этапов репродукции (цветение, опыление, оплодотворение и диссеминация) отсеивает часть видов *Coelogyne*, потенциально способных к семенному размножению *in vitro*. Наиболее критическими этапами являются опыление и оплодотворение. Из 38 таксонов *Coelogyne*, представленных в коллекции Фондовой оранжереи ГБС РАН, 5 видов не цвели в течение 4 лет, 13 видов не опылились, 9 не достигли стадии зиготы, 2 вида завязали партенокарпические плоды без семян. Зрелые плоды с полноценными семенами удалось получить у 10 видов, опыленных ксеногамным способом и одного подвида (*C. speciosa* subsp. *fimbriata*), опыленного гейтоногамным способом (рис. 9).

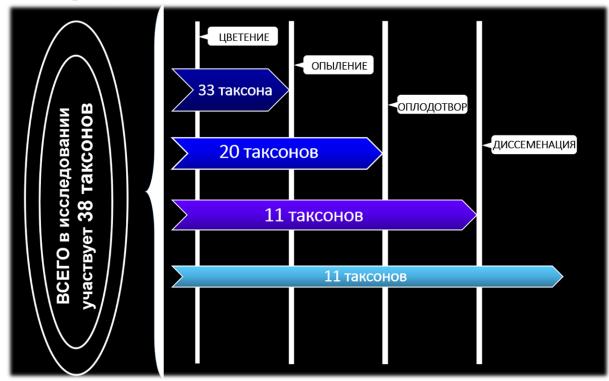


Рисунок 9. Итоговая схема прохождения 4 этапов репродукции *Coelogyne*.

Разнообразие спектров цветения в оранжерейных условиях включает 6 вариантов, от однократного волнообразно-устойчивого до постоянного, с нарастанием и развитием бутонов на каждом соцветии в течение нескольких лет подряд. У экспериментальных представителей рода *Coelogyne* выявлено 5 типов взаимного развития вегетативной и генеративной частей вегетативногенеративного побега и 3 структурно-ритмологических типа соцветий (односезонное, интеркалярное, всесезонное).

Второй этап репродукции (опыление) прошли 19 видов и один подвид *Coelogyne* из 10 секций, представленных в коллекции несколькими образцами или несколькими клонами. Показан высокий уровень самонесовместимости в

пределах одного клона. Выявлены следующие особенности мегаспорогенеза и мегагаметогенеза модельных видов *Coelogyne*: семязачаток имеет широкое микропиле, повернутое к плаценте; нуцеллус элиминируется на стадии зрелого зародышевого мешка; семязачаток с двумя двойными интегументами; наличие фуникулуса; зародышевый мешок моноспорический, Polygonumтипа; в большинстве зародышевых мешков отмечена редукция второго митоза.

Третий этап репродукции (оплодотворение) успешно прошли 10 видов и 1 подвид Coelogyne из 8 секций. У разных видов Coelogyne от момента опыления до оплодотворения проходит от 3 до 5 месяцев. Оплодотворение порогамное, ядра синергид при оплодотворении не разрушаются, в зародышевых мешках с неполным составом генеративных элементов ядро центральной клетки обычно одиночное, в 8-ядерных зародышевых мешках полярные ядра соединяются, но не сливаются между собой, эндосперм не образуется. У зародыша выявлено отсутствие деления базальной клетки cb и отсутствие у нее гаусториальных выростов, образование интраовулярного многоклеточного нитевидного суспензора с особыми придаточными клетками-крючками. Зародыш такой структуры значительно отличается от зародышей с типом II эмбриогенеза по классификации Swamy (1949) и Orchideae-типом по классификации Clements (1999), тем более его нельзя причислить и к плезиоморфному типу эмбриогенеза с одноклеточным суспензором.

Четвертый этап репродукции (диссеминация) связан с особенностями формирования, структуры и вскрывания стенок плода *Coelogyne*. Стенка плода дифференцирована на эпикарпий, состоящий из наружной эпидермы и основной ткани, мезокарпий и эндокарпий. Однослойная эпидерма эпикарпия и 2–3 периферических слоя основной ткани эпикарпия представлены лигнифицированными клетками. Такой тип плода ранее не был описан для покрытосеменных растений.

Показано 3 варианта образования плодов *Coelogyne*: нормально развитые плоды с полноценными семенами, плоды с семенами без зародыша и партенокарпические плоды без семязачатков. Также нами было обнаружено, что сроки склерификации эпикарпия совпадают со сроками образования женского гаметофита (2,5–3 месяца после опыления). Однако наше первоначальное предположение о корреляции между завершением образования женского гаметофита и склерификацией верхнего слоя эпикарпия у нормально развитых плодов не подтвердилось, поскольку склерификация эпикарпия у партенокарпических плодов без семязачатков начиналось в эти же сроки.

Выводы

- 1. В условиях оранжерейного культивирования каждый из последовательных этапов репродукции (цветение, опыление, оплодотворение и диссеминация) отсеивает часть видов, потенциально способных к семенному размножению. Из 38 таксонов *Coelogyne* только 10 видов и один подвид образовали полноценные семена, а также достигли стадии диссеминации. Наиболее критическими этапами являются опыление и оплодотворение.
- 2. Впервые описан новый для орхидных структурно-ритмологический тип многолетнего соцветия всесезонное соцветие (открытый брактеозный колос с непрерывным многолетним нарастанием). Морфологические особенности всесезонного соцветия: неопределенно долгое моноподиальное нарастание главной оси соцветия и утолщение всех междоузлий цветоносной части оси соцветия.
- 3. Подтвержден высокий уровень самонесовместимости *Coelogyne* в пределах одного клона. Способ опыления достоверно влияет на завязываемость плодов, у всех экспериментальных видов эффективность ксеногамного опыления была выше по сравнению с гейтоногамным опылением.
- 4. Семязачатки *Coelogyne* анатропные, тенуинуцеллятные, битегмальные, фуникулярные; зародышевые мешки моноспорические, Polygonum-типа; лабильность числа ядер в зародышевых мешках от 4 до 8. В зрелом зародышевом мешке синергиды смещены к центру, при оплодотворении их ядра не разрушаются содержимым пыльцевой трубки, а прилегают к суспензору и длительное время сохраняются в зародышевом мешке; полярные ядра не сливаются.
- 5. У зародыша выявлено образование многоклеточного нитевидного суспензора с интеркалярным ростом, отсутствие деления базальной клетки *cb* на всем протяжении эмбриогенеза; впервые в составе нитевидного суспензора выявлено образование особых придаточных клеток-крючков. Зародыш интраовулярный, его суспензор сворачивается и локализуется в пределах зародышевого мешка, не выходит за его пределы и не внедряется в стенки плаценты. Выявленные особенности позволяют описать у представителей рода *Coelogyne* новый тип эмбриогенеза.
- 6. Плоды *Coelogyne* являются нижними трехмерными паракарпными коробочками. Эпидерма эпикарпия и 2–3 периферических слоя основной ткани эпикарпия представлены лигнифицированными клетками. Такой тип плода ранее не был описан для покрытосеменных, поэтому его предложено выделить в новый морфогенетический тип плода.
- 7. Род *Coelogyne* характеризуется существенной длительностью процессов образования семязачатка и женского гаметофита (3–5 месяцев между опылением и оплодотворением) и созревания плода (18–26 месяцев после опыления).

Список работ, опубликованных по теме диссертации В изданиях, включенных в базу данных Scopus:

- 1. Kolomeitseva G., Koval V., Ryabchenko A. The Structural–Rhythmological Organization of *Coelogyne* (Orchidaceae Juss.) Inflorescences // Int. J. Plant Biol. 2023. Vol. 14. P. 286–298. https://doi.org/10.3390/ijpb14010024
- 2. Kolomeitseva G.L., Koval V.A., Ryabchenko A.S., Babosha A.V. Megasporogenesis and megagametogenesis in *Coelogyne speciosa* subsp. *fimbriata* (J.J.Sm.) Gravendeel (Orchidaceae Juss.) // Int. J. Plant Biol. 2023. Vol. 14. P. 190–198. https://doi.org/10.3390/ijpb14010016

В прочих изданиях:

- 3. Коваль В.А., Коломейцева Г.Л. Типы развития соцветий представителей рода *Coelogyne* Lindl. (Orchidaceae Juss.) / Материалы Международной научной конференции «Биоморфология растений: традиции и современность». Киров: Изд-во Вятского университета, 2022. С. 239–244.
- 4. Коваль В.А., Здравчев Н.С., Бобров А.В., Романов М.С., Иовлев П.С., Тимченко А.С., Коломейцева Г.Л. Структура стенки плода *Coelogyne speciosa* Lindl. subsp. *fimbriata* (J.J.Sm.) Gravendeel (Orchidaceae) / Материалы Международной научной конференции «Биологическое разнообразие Кавказа и Юга России». Магас: Изд-во АЛЕФ, 2022. С. 173–176.
- 5. Коломейцева Г.Л., Коваль В.А. *Coelogyne speciosa* subsp. *fimbriata* (J.J.Sm.) Gravendeel в коллекции Фондовой оранжереи ГБС РАН / Материалы XII Международной конференции «Охрана и культивирование орхидей». Москва: Изд-во МГУ, 2022. С. 122–126.