

## TECHNIQUE OF BOTANICAL RESEARCHES

UDK 58.002:511.1. :581.48

V. V. Nazarov

SMALL SEED AND OVULE CALCULATION TECHNIQUE  
WITH SPECIAL REFERENCE TO THE *ORCHIDACEAE*В. В. НАЗАРОВ. МЕТОДИКА ПОДСЧЕТА МЕЛКИХ СЕМЯН И СЕМЯПОЧЕК  
(НА ПРИМЕРЕ СЕМ. *ORCHIDACEAE*)

A new technique of definition seed production in orchids is proposed. Before account the seeds and ovules are distributed in a special way in a single layer and photographed in transmitted light. Calculation is realized on the photograph by piercing their images. The rate of calculation is 130-150 units per minute.

Studding reproductive capacity one of the most important aspects in flowering plant biology there is a necessity to definite the number of seeds and ovules in a single flower, since these data are considered to be initial ones for obtaining the other features. Some families of flowering plants, for example, *Orchidaceae* Juss, *Orobanchaceae* Vent., in which fruits there is a great amount (up to 6 000 000) of dusty (0.00039 — 0.014 mg) seeds, present particular difficulty (Arditti, 1967; Teryokhin, 1977).

The techniques of calculation of such seeds existing (Darwin, 1862; Salisbury, 1942; Mehrhoff, 1983) based on recalculation of a sample from main set, are not accurate enough. Gravimetric method can give a great variation in results because of the heterogeneity of seeds at different types of pollination. Thus, relating to *Orchis purpurea* Huds. we found that the mass of 1000 seeds developed as a result of self-pollination was  $1.04 \pm 0.043$  g, whereas the seeds formed as a result of cross pollination were significantly heavier  $1.92 \pm 0.030$  g. The difference in weight in this case was conditioned both by smaller sized of seeds resulting from self-pollination and the presence in composition of a large number of aborted seeds. High quantity of aborted seeds in certain fruits was observed also in the other plants. Herewith such seeds were removed from a sample before weighting (Salisbury, 1942) that complicates the technique. Using methods of "diluted samples" give considerable error by the irregular distribution of seeds in the liquid volume or on the surface (Rabotnov, 1950).

The technique of calculation of orchid seeds, we proposed, is based on their regular distribution in a single layer on the water surface. The orchid seeds are known not to be wetted by water and they can stay on its surface within a few weeks (Burgeff, 1936).

Closed capsules with ripe seeds are placed in packages of opaque paper. Transparency of paper allows indicate the moment of capsule ripening and seed precipitation into the package. The eds are removing on the surface of water poured onto a glassplate

50 X 50 mm. Uniform distribution of seeds in a single layer is achieved by stirring the water by a dissecting needle. Herewith the surface area of aqua must be equal or slightly bigger than the total projection of seeds. For realizing this condition the seeds are scattered on the water surface with a smaller area than they can occupy. Adding water drop wise and stirring it with a needle one can achieve uniform distribution of seeds in a single layer. Then plates are covered by a cap with ventilation holes until the complete water evaporation. Whereupon the seeds are remained lying on the plate in a single layer and are photographed in transmitted light. The seed calculation is realized on the photograph. Herewith the seed images are punctured by a needle connected to one of the contact of the button “+” in microcalculator “Electronics”.

The second contact of the button is connected with aluminum plate on which the photograph disposes. Before the calculation the button with number “1” is pressed. While puncturing the images with a needle the circuit occurs with summation of electric impulses on the indicator. The rate of calculation herewith is 130–150 units per minute. Missing seed images are easily detected by viewing photos in transmitted light.

The definition of seed number on the photograph can be realized by two ways: by the calculation of all images and by the calculation of images on the plot of a certain size with subsequent recalculation of the whole area they occupy. In the second case the total area is detected with the help of planimeter. The calculation of seeds in 15 capsules of *Cephalanthera longifolia* (L.) Fisher according to the first and second methods demonstrated that in order to obtain reliable results (with a mistake not more than 5 %) the selected area should be not less than 5-10 % from the total area clusters. It is better to take the sample at the center in the form of transect.

The definition of ovule number is also based on the calculation of their photograph images. In order to distribute the ovules in a single layer the procedure of making pressure preparations is used (Pausheva, 1974). Immediately after flower opening the ovary is separated from perianth petals and put into fixing a mixture of the following composition: alcohol of 70 %, formalin of 40 % and glacial acetic acid in a ratio 10 : 3 : 1. As it is known, the ovules of orchids in this moment are presented by small ovule primordia (Savina, 1965), that less contributes to their mutual overlap while making pressure preparations. From the mixture the ovaries are removed into 1 normal hydrochloric acid solution for 5-7 minutes. At opening the placentas with ovules are isolated from the ovary and are stained for 5 minutes in one percent alcohol solution of lihtgryun. Then the placentas are slightly dried and spread on glass slide in a drop of glycerine. Cover glass is places on top and the pressure preparation is made. The preparations are photographed in transmitted light.

The ovary in most orchids is paracarpic and is consisted from three carpels with parietal placenta on the each. The sizes, the degree and character of placenta rumination are varied within a family (Teryokhin, 1977). However the placentas of the same ovary are practically uniform by these features. This allows to define the number of ovules in the ovary also by two ways: by recalculation of ovules on the all placentas of the ovary or on a single one. As recalculation of ovules in 10 ovaries of *Platanthera bifolia* (L.) Rich. showed, the error when using the second method does not exceed 10 %.

This technique of definition number of small seeds and ovules was tested on five species of orchids from palearctic zone: *Cephalanthera longifolia*, *Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb., *P. bifolia*, *Dactylorhiza romana* (Sib. Et Mauri) Soo, *D. incarnata* (L.) Soo. Herewith the seeds were calculated in 185 capsules and ovules in 210

ovaries of species mentioned. The technique given could be applied to the other plants as well that are resemble to orchids by seed structure.

#### LIST OF REFERENCES

*Pausheva Z. P.* Praktikum po citologii rastenij. M.: Kolos, 1974. 288 p. — *Rabotnov T. A.* Zhiznennyj cykl mnogoletnih travjanistykh rastenij v lugovykh cenozah // Geo-botanika. M.; L.: Izd-vo AN SSSR, 1950. V. 6. P. 7—204. — *Savina G. I.* Razvitie polovykh jelementov i process oplodotvorenija u nekotorykh vidov Orchis // Bot. zhurn. 1965. V. 50, N 1. P. 96—103. — *Teryokhin E. S.* Parasitic flower plants. L.: Nauka, 1977. 220 p. — *Arditti J.* Factors affecting the germination of orchids seed // Bot. Rev. 1967. Vol. 33, N 1. P. 1—97. — *Burgeff H.* Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen. Jena, 1936. 312 S. — *Darwin Ch.* The various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects, and on the good effects of intercrossing. London, 1862. 365 p. — *Mehr-hoff L. A.* Pollination in genus *Isotria* (Orchidaceae) // Amer J. Bot. 1983. Vol. 70, N 10. P. 1444—1453. — *Salisbury E. J.* The reproductive capacity of plants. Studies in quantitative biology. London, 1942. 244 p.

Simferopol state university.

Received 21 IX 1988.

#### [ZITATION VARIATION]

##### [English]

Nazarov V.V. (1989) Small seed and ovule calculation technique with special reference to the Orchidaceae. *Bot. Zhurn.* (Moscow & Leningrad) 74 (8): 1194-1196.

##### [Translit]

Nazarov V.V. Metodika podscheta melkikh semyan i semyapochek (na primere sem. Orchidaceae). - *Botanicheskij Zhurnal*, 1989, v.74 (8), p. 1194-1196.

##### [Russian]

Назаров В. В. Методика подсчета мелких семян и семяпочек (на примере сем. Orchidaceae) // *Бот. журн.* 1989. Т. 74. № 8. С. 1194 - 1196.

# МЕТОДИКА БОТАНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 58.002:511.1. : 581.48

**В. В. Назаров**

## МЕТОДИКА ПОДСЧЕТА МЕЛКИХ СЕМЯН И СЕМЯПОЧЕК (НА ПРИМЕРЕ СЕМ. *ORCHIDACEAE*)

V. V. N A Z A R O V. SMALL SEED AND OVULE CALCULATION TECHNIQUE  
WITH SPECIAL REFERENCE TO THE *ORCHIDACEAE* FAMILY

Предлагается новая методика определения семенной продуктивности у орхидных. Перед подсчетом семена и семяпочки распределяются особым способом в один слой и фотографируются в проходящем свете. Подсчет производится на фотоснимке прокалыванием их изобразений. Скорость подсчета составляет 130–150 единиц в минуту.

При изучении репродуктивной способности — одного из важнейших аспектов биологии цветковых растений — возникает необходимость определения числа семян и семяпочек на один цветок, так как эти данные являются исходными для получения других показателей. Особую трудность в этом отношении представляют некоторые семейства цветковых растений — *Orchidaceae* Juss., *Orobanchaceae* Vent., в плодах которых содержится большое число (до 6 000 000) пылевидных (0.00039 — 0.014 мг) семян (Arditti, 1967; Терехин, 1977).

Существующие методики подсчета таких семян (Darwin, 1862; Salisbury, 1942; Mehrhoff, 1983), основанные на пересчете определенной выборки из основной совокупности, недостаточно точны. Весовой метод может давать сильное варьирование результатов из-за разнородности семян при разном типе опыления. Так, в отношении *Orchis purpurea* Huds. мы установили, что масса 1000 семян, образовавшихся в результате самоопыления, составляла  $1.04 \pm 0.043$  г., тогда как семена, возникшие от перекрестного опыления, были значительно тяжелее —  $1.92 \pm 0.030$  г. Разница в массе в этом случае обуславливалась как более мелким размером семян, возникших от самоопыления, так и присутствием в их составе большого числа абортированных. Высокое число абортированных семян в отдельных плодах наблюдалось и у других растений. При этом такие семена удалялись из выборки перед взвешиванием (Salisbury, 1942), что усложняло методику. Применяемые методы разбавленных образцов дают значительную погрешность вследствие неравномерного распределения семян в объеме или на поверхности (Работнов, 1950).

Предлагаемая нами методика подсчета семян у орхидных основана на равномерном распределении их в один слой по поверхности воды. Известно, что семена орхидных не смачиваются водой и могут находиться на ее поверхности в течении нескольких недель (Burgeff, 1936).

Нераскрытые коробочки со спелыми семенами помещаются в пакетики из прозрачной бумаги. Прозрачность бумаги позволяет определять момент созревания коробочек и высыпания семян в пакет. Последние переносятся

<sup>1</sup> На данную методику подана заявка N 4 321 402/24 с приоритетом 26 X 1987 на изобретение «Способ подсчета мелких семян», по которой получено положительное решение от 8 IV 1988.

на поверхность воды, налитой на стеклянную пластину 50 x 50 мм. Равномерное распределение семян в один слой достигается помешиванием воды препаровальной иглой. При этом площадь поверхности жидкости должна равняться или немного превышать сумарную проекцию семян. Для выполнения этого условия семена высыпаются на поверхность воды с меньшей площадью, чем они могут занять. Добавляя воду по капле и помешивая ее иглой, добиваются равномерного распределения семян в один слой. Затем пластины накрываются колпаком с отверстиями для вентиляции до полного испарения воды. После чего семена остаются лежать на пластине в один слой и фотографируются в проходящем свете. Подсчет семян осуществляется на фотоснимке. Изображения семян при этом прокалываются иглой, подключенной к одному из контактов кнопки «+» микрокалькулятора «Электроника».

Второй контакт кнопки подсоединяется к алюминиевой пластине, на которой располагается фотоснимок. Перед началом подсчета нажимается кнопка с цифрой «1». При прокалывании изображения иглой происходит замыкание цепи с суммированием импульсов на индикаторе. Скорость подсчета составляет при этом 130–150 единиц в минуту. Пропущенные изображения семян легко обнаруживаются при просмотре фотоснимков на просвет.

Определения числа семян на фотоснимке может выполняться двумя способами: подсчетом всех изображений и подсчетом изображений на участке определенного размера с последующим пересчетом на всю площадь, которую они занимают. Общая площадь скопления во втором случае определяется при помощи планиметра. Подсчет семян в 15 коробочках *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch первым и вторым способами показал, что для получения достоверных результатов (с ошибкой не превышающей 5%) выборочная площадь должна составлять не менее 5–10% общей площади скопления. Выборку лучше брать по центру в виде трансекты.

Определение числа семяпочек также основано на пересчете их фотографического изображения. Для расположения семяпочек в один слой используется методика приготовления давленных препаратов (Паушева, 1974). Непосредственно после раскрытия цветка завязь отделяется от лепестков околоцветника и помещается в фиксирующую смесь FAA состава: 70%-ный спирт, 40%-ный формалин и ледяная уксусная кислота в пропорции 10 : 3 : 1. В этот момент семяпочки у орхидных, как известно, представляют собой небольшие меристематические бугорки (Савина, 1965), что в меньшей степени способствует их взаимному перекрыванию при изготовлении давленных препаратов. Из фиксатора завязи переносят в 1 н. рствор соляной кислоты на 5–7 мин. При вскрытии из завязи вычлениают плаценты с семяпочками, которые окрашивают 5 мин в 1%-ном спиртовом растворе лихтгрюна. Затем плаценты немного подсушивают и расправляют на предметном стекле в капле глицерина. Сверху накладывают покровное стекло и делают давленный препарат. Препараты фотографируют в проходящем свете.

Завязь у большинства орхидных паракарпная и состоит из трех плодolistиков с париетальной плацентой на каждом. Размер, степень и характер руминированности плацент отличаются разнообразием в пределах семейства (Терехин, 1977). Однако плаценты одной завязи практически однородны по этим показателям. Это позволяет определять число семяпочек в завязи также двумя способами: пересчетом семяпочек на всех плацентах завязи или только на одной. Как показал подсчет семяпочек в 10 завязях *Platanthera bifolia* (L.) Rich., ошибка не превышает 10% при использовании второго способа.

Приведенная методика определения числа мелких семян и семяпочек апробирована на пяти видах орхидей умеренной зоны: *Cephalanthera longifolia*, *Platanthera chlorantha* (Cust.) Reichenb., *P. bifolia*, *Dactylorhiza romana* (Sib. et Mauri) Soo, *D. incarnata* (L.) Soo. При этом семена подсчитаны в 185 коробоч-

ках, а семяпочки – в 210 завязях указанных видов. Данная методика может быть применена и к другим растениям, которые обнаруживают сходство с орхидными в строении семян.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. 288 с. — Работнов Т. А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Геоботаника. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950. Вып. 6. С. 7—204. — Савина Г. И. Развитие половых элементов и процесс оплодотворения у некоторых видов *Orchis* // Бот. журн. 1965. Т. 50, N1. С. 96—103. — Терехин Э. С. Паразитные цветковые растения. Л.: Наука, 1977. 220 с. — Arditti J. Factors affecting the germination of orchids seed // Bot. Rev. 1967. Vol. 33, N1. P. 1—97. — Burgeff H. Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen. Jena, 1936. 312 S. — Darwin Ch. The various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects, and on the good effects of intercrossing. London, 1862. 365 p. — Mehrhoff L. A. Pollination in genus *Isotria* (Orchidaceae) // Amer J. Bot. 1983. Vol. 70, N10. P. 1444—1453. — Salisbury E. J. The reproductive capacity of plants. Studies in quantitative biology. London, 1942. 244 p.

Симферопольский государственный университет.

Получено 21 IX 1988.