

Villa, Rosalba Sebastiana (1979) *Osservazioni sull'embriogenesi di Gennaria diphylla e Barlia robertiana (Orchidaceae)*. Bollettino della Società sarda di scienze naturali, Vol. 18 (1978), p. 211-221. ISSN 0392-6710.

<http://eprints.uniss.it/3327/>

ANNO XII - VOL. XVIII

S. S. S. N.

1978

BOLLETTINO

della

SOCIETA' SARDA
DI SCIENZE NATURALI

Consulenti editoriali per questo volume:

Prof. Luigi Barbanti
Prof. Francesco Cariati
Prof. Giorgio Cignarella
Prof. Tullio Dolcher
Prof. Nullo Glauco Lepori
Prof. Guido Moggi
Prof. Enio Nardi
Prof. Ione Rossi
Prof. Livia Tonolli

Direttore Responsabile e Redattore
Prof. FRANCA VALSECCHI

Autorizzazione Tribunale di Sassari n. 70 del 29-V-1968

**Osservazioni sull'embriogenesi di *Gennaria diphylla*
e *Barlia robertiana* (Orchidaceae)**

ROSALBA VILLA*

Il decorso dello sviluppo nelle varie fasi della riproduzione nelle Orchidee, dalla formazione dei meristemi dell'ovario all'embriogenesi e alla successiva differenziazione, presenta caratteristiche del tutto particolari e di grande interesse biologico. Bastino citare: le correlazioni tra pollinio ed ovario per quanto riguarda la durata della vitalità del fiore, l'interruzione dello sviluppo degli ovuli che viene ripreso soltanto per effetto dell'impollinazione, l'enorme numero di semi, la riduzione della duplice fecondazione tipica delle Angiosperme a una fecondazione singola, il ridottissimo sviluppo raggiunto dagli embrioni nel seme, lo sviluppo postgerminativo di un corpo indifferenziato, la simbiosi fungina obbligatoria diffusa a tutta la pianta.

Queste caratteristiche sono per lo più ben note e alcune individuate addirittura nel secolo scorso, ma la loro rilevanza, la loro larga affermazione nella famiglia e la diversità dei particolari con cui si presentano nei diversi generi, ne fanno ancora un interessante campo di ricerche per alcuni problemi generali della biologia vegetale (regolazione dello sviluppo, differenziazione).

Il presente lavoro rappresenta un risultato delle osservazioni che in questo settore si svolgono presso l'Istituto Botanico di Sassari, e riguarda due specie osservate nel loro ambiente naturale:

* Istituto Botanico dell'Università di Sassari.

Gennaria diphylla e *Barlia robertiana* (già indicata come *Orchis longibracteata* o *Barlia longibracteata*). Ci si è soffermati su *Gennaria* in quanto la specie risulta non ancora studiata embriologicamente e su *Barlia* perchè la specie è particolarmente disponibile per la sua diffusione, prolungata fioritura, lenta ed abbondante fruttificazione.

Di queste due specie si è analizzato lo sviluppo del gametofito femminile e l'embriogenesi. Come si è già accennato, lo zigoto in questa famiglia non origina un embrione in cui siano chiaramente abbozzati gli organi della futura pianta come nelle altre Angiosperme, ma alla liberazione dei semi dall'ovario questi contengono soltanto un piccolo corpo ovoide, che per questa sua limitatezza e indifferenziazione è stato denominato proembrione.

Da questo, alla germinazione, deriva un corpo che continua a svilupparsi senza assumere alcuna delle caratteristiche di un embrione e che viene indicato col termine molto espressivo di «protocormo», termine che secondo quanto viene riportato da GOEBEL (1913), è stato creato da Treub per indicare la analoga fase di indifferenziazione che precede l'organizzazione della pianta vera e propria in certi Licopodi. CHAMPAGNAT recentemente (1971) lo definisce come «una massa di parenchima senza polarità». Da questo poi si differenzierà la plantula senza passare per uno stadio di embrione morfologicamente definito.

Proprio per questo tipo di sviluppo le Orchidee possono presentare dunque per lo studio della differenziazione interesse del tutto particolare.

Gennaria diphylla (Link) Parl. è una specie non molto comune che ha un areale piuttosto ristretto: Sardegna, Corsica, Spagna, Nord Africa ed Isole Canarie. In Sardegna vive su terreni piuttosto aridi all'ombra di fitti cespugli di cisto e lentischio. E' una piantina esile con due sole foglie, che fiorisce da gennaio a marzo, formando un racemo di 20-30 fiori piccoli di colore giallo verdastro.

Barlia robertiana (Loisel.) W. Greuter è un'orchidea piuttosto comune in Sardegna e in gran parte del Mediterraneo sulle dune mobili o consolidate e nei terreni incolti. E' una pianta robusta, che sviluppa densi racemi con fiori piuttosto grandi, violacei, a fioritura prolungata da gennaio ad aprile.

Metodo

Il materiale è stato fissato con la miscela cromo-acetica di Karptschenko o col fissativo alcool-acetico di Carnoy. L'analisi embriologica ed embriogenetica è stata fatta su sezioni di 15 μ di materiale incluso in paraffina, colorate con ematossilina Delafield's o col Feulgen, parallelamente a sondaggi e controlli operati su sezioni a fresco e su schiacciamento.

La quantità di DNA nei nuclei è stata dosata con un microspettrofotometro per luce fluorescente (Leitz Opak Fluor) da preparati di ovari ottenuti per schiacciamento e colorati al Feulgen.

Risultati

Gennaria diphylla

a) *Sviluppo del gametofito femminile*: la meiosi e lo sviluppo del gametofito femminile si svolgono senza caratteristiche particolari (Fig. 1). Già nei primi stadi di sviluppo dell'ovulo è ben visibile una cellula molto più grande delle circostanti che senza ulteriori divisioni, come in tutte le orchidee, diventa cellula madre delle megaspore. Avviene quindi una regolare meiosi con formazione di una tetrade di cellule distinte, una delle quali prende subito il sopravvento. Da questa megaspore, mentre le altre necrotizzano, si origina in seguito a tre divisioni un tipico gametofito ottonucleato. Si può notare che, in questo, le antipodi hanno una vita molto breve (Fig. 1, e).

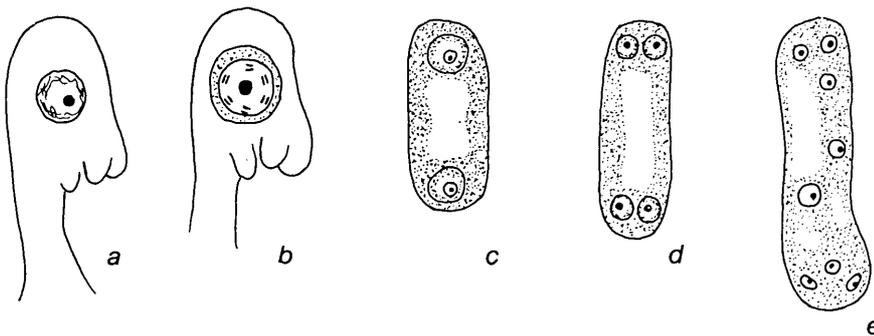


Fig. 1 - Alcuni stadi dello sviluppo del gametofito femminile in *Gennaria diphylla*. (a, b, c, d, e, x 240)

b) *Decorso dell'embriogenesi*: al momento della fecondazione gli ovuli sono costituiti da qualche decina di cellule simili tra loro; se ne distingue solo lo zigoto per il suo volume molto maggiore (fig. 1,a). La prima divisione dello zigoto dà origine a due cellule: una apicale verso la calaza, ed una basale verso il micropilo (Fig. 2,b). La cellula apicale successivamente si divide in senso longitudinale, quella basale in senso trasversale (Fig. 2,c,d).

Dalle due cellule apicali, attraverso diverse divisioni, si formerà un corpo ovoidale che costituirà la massa principale del proembrione. Le due cellule inferiori invece, con un'ulteriore divisione con setti trasversali daranno una formazione a filamento di quattro cellule, che successivamente si allungano e vanno verosimilmente considerate come il sospenditore dell'embrione (Fig. 2,e,f,g).

Nella maggior parte dei casi le divisioni si susseguono come descritto sopra, ma talvolta in alcuni embrioncini, già formati da un certo numero di cellule, la cellula apicale rimane a lungo indivisa (Fig. 2, h). Gli embrioni adulti risultano però sempre ugualmente conformati. Il loro sospenditore presenta sempre quattro o cinque cellule (Fig. 2,i).

All'interno dell'embrione continuano intanto le mitosi che ne fanno aumentare sempre più il volume fino al raggiungimento di un corpo formato da oltre un centinaio di cellule; poi la maturazione del seme prosegue senza ulteriori mitosi (Fig. 2, j, k, l, m).

Facendo a mano delle sezioni di ovario maturo e colorandole con la tecnica del PAS, si è potuto mettere in evidenza un marcato strato di polisaccaridi tutto intorno al corpo dell'embrione, che ne mette in evidenza l'isolamento fisiologico dai tessuti circostanti.

Nel corpo dell'embrione quando ancora sono presenti mitosi si vanno affermando delle differenze tra le dimensioni delle cellule; mentre al polo calazale, cioè all'apice dell'embrione, le cellule restano piccole, quelle della zona centrale si ingrossano notevolmente e le due zone appaiono piuttosto nettamente delineate. Anche il loro nucleo aumenta di volume; il rapporto tra i diametri dei nuclei più piccoli e di quelli più grossi arriva a circa 1:5.

Sono stati fatti anche dosaggi citofotometrici della quantità di DNA presente nei nuclei delle cellule di questi embrioni sia in stadi di 40-50 cellule con mitosi ancora presenti, sia in quelli di embrioni ormai quiescenti. Si è potuto constatare che vi è una variazione della quantità di materiale genetico già negli embrioni

ancora in divisione e questa va aumentando negli stadi successivi sino allo stadio di quiescenza. Le difficoltà incontrate nel dosaggio del DNA non consentono per ora dei dati sufficientemente precisi, ma in via preliminare si può affermare che essi variano con un rapporto circa da 1 a 5.

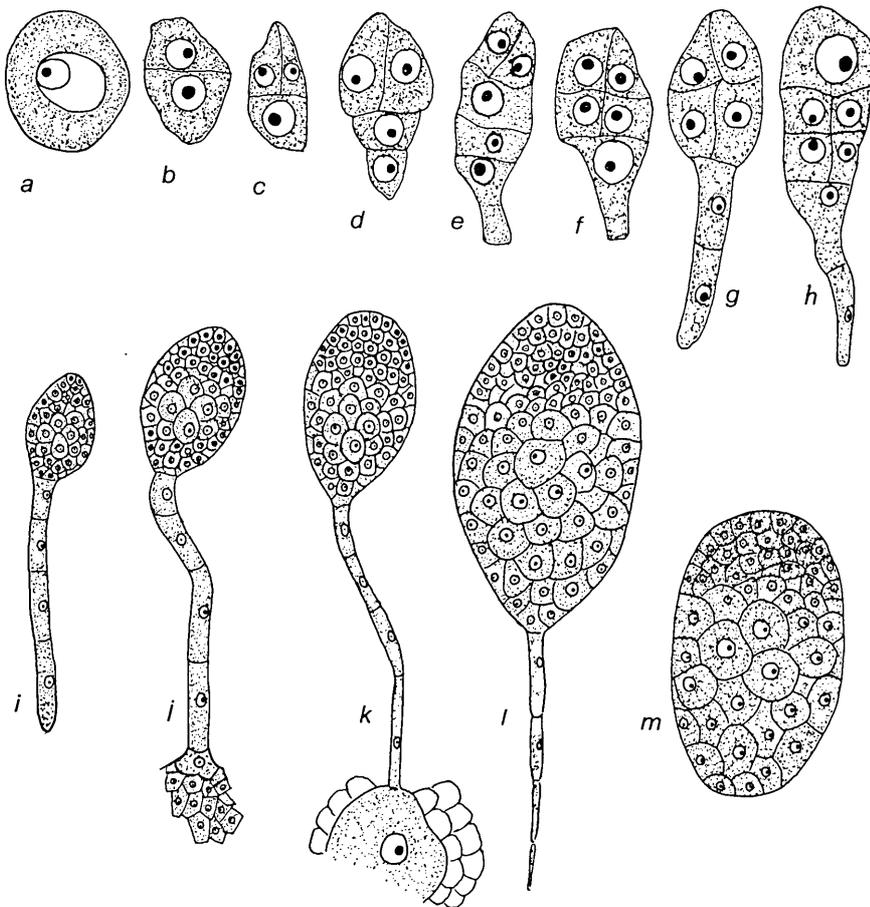


Fig. 2 - Decorso dell'embriogenesi in *Gennaria diphylla*. (a, b, c, d, e, f, g x 600; h, i, j, k, l, m, x 90)

Le differenze del volume nucleare dedotte dai sopracitati diametri dei nuclei (da 1 a 5) starebbero tra loro in un rapporto da 1 a 125. Ovviamente non è da attendersi che volume nucleare e quantità

di DNA siano proporzionali, ma la forte variazione nell'una e nell'altra grandezza si confermano a vicenda e sottolineano che nell'embriogenesi di questa specie si manifestano molto precocemente delle differenze nel grado di ploidia nelle diverse cellule.

Intanto il sospensore, le cui cellule formano un filamento sempre più lungo, emerge dal micropilo e si avvicina alle cellule della placenta (Fig. 2,j). La cellula terminale si ipertrofizza rigonfiandosi tanto che diviene a volte grossa come l'embrione stesso (Fig. 2,k). Prima che l'embrione entri nello stadio di quiescenza la cellula terminale ed il filamento cellulare che la collega all'embrione vanno riducendosi fino a scomparire del tutto (Fig. 2,l); talvolta però qualche residuo del sospensore rimane anche nel seme maturo.

Si è considerata anche la presenza dell'amido durante l'embriogenesi rilevandolo con la colorazione allo jodio. Sin dai primi stadi nel proembrione compaiono granuli d'amido sia nella parte superiore sia nel sospensore; l'amido va poi aumentando notevolmente nel corpo dell'embrione, transitoriamente nel sospensore, compresa la sua cellula terminale rigonfia.

c) *Modificazione dell'ovulo durante l'embriogenesi.* L'ovulo è anatropo, con funicolo lungo e placentazione parietale marginale. Durante l'embriogenesi i suoi tegumenti subiscono delle modificazioni che lo trasformano in un tegumento con le tipiche caratteristiche di quello del seme di orchidea. Infatti subito dopo la fecondazione

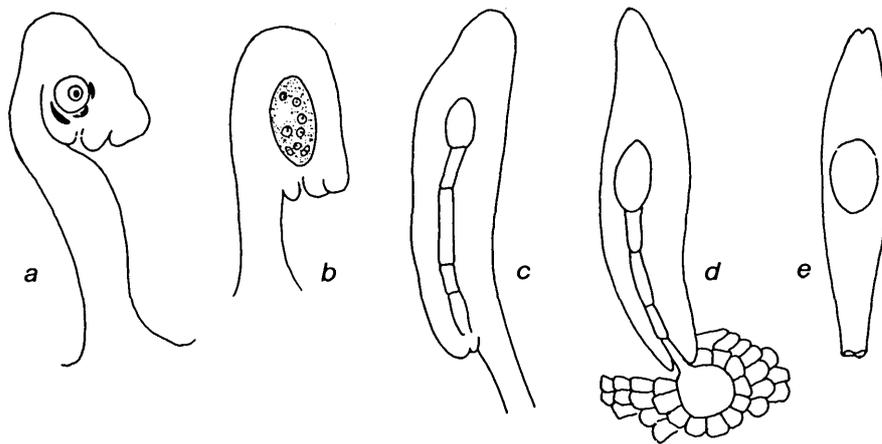


Fig. 3 - Modificazione dell'ovulo durante l'embriogenesi in *Gennaria diphylla*.
(a, b, x 200; c, d, e, x 60)

le cellule del suo tegumento incominciano a distendersi per cui l'ovulo ingrandisce e si allunga soprattutto verso la zona calazale (Fig. 3).

Nelle cellule del tegumento che, prima della fecondazione, o nei primi stadi dell'embriogenesi, contengono nuclei piuttosto grossi, le pareti dapprima sottili, vanno sviluppando, man mano che l'embrione si accresce, degli ispessimenti caratteristici filiformi a rete che successivamente lignificano. Intanto anche i nuclei vanno via via riducendo il loro volume fino a scomparire del tutto in uno stadio in cui l'embrione è già sviluppato, ma presenta ancora mitosi.

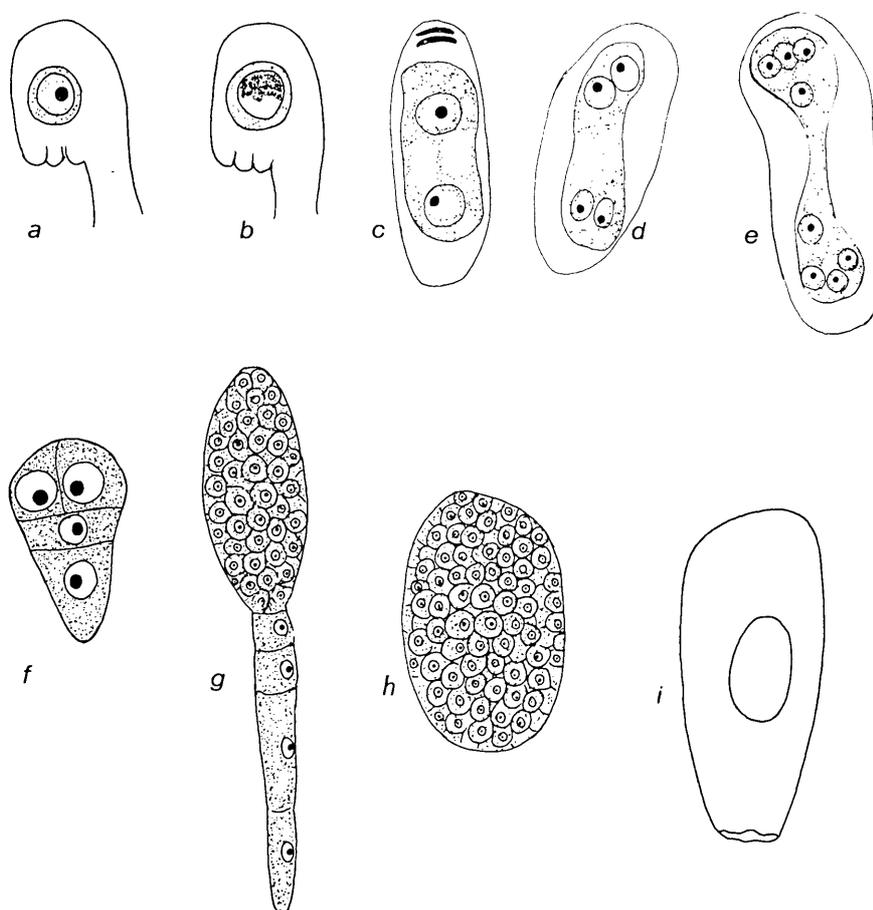


Fig. 4 - *Barlia robertiana*: a-c, sviluppo del gametofito; f-h, embriogenesi; i, seme. (a, b, c, d, e, x 240; f, x 600; g, h, i, x 90)

Un'analisi delle pareti dell'ovulo dopo colorazione con jodo-joduro, mostra una grande quantità di granuli di amido che scompare completamente solo quando le pareti dell'ovulo si sono lignificate del tutto.

Barlia robertiana

Sviluppo del gametofito femminile ed embriogenesi. Lo sviluppo del gametofito e dell'embrione di *Barlia*, la cui embriogenesi era già stata oggetto di studio da parte di VEYRET (1955), è nelle sue linee principali simile a quello di *Gennaria diphylla*. Una sintesi dei diversi stadi sia embrionali che embriogenetici è rappresentata nella fig. 4.

Alcuni aspetti tuttavia meritano di essere citati:

- 1) all'apice calazale permane a lungo vitale una zona della nocella che va scomparendo solo quando il proembrione si è già completato;
- 2) il sospensore, in genere formato da quattro-sei cellule, si atrofizza precocemente: lo si può osservare solo fino a stadi con embrioncini di qualche decina di cellule; non fuoriesce dal micropilo o ne emerge appena la sua cellula terminale;
- 3) nell'embrione non si nota la distinzione osservata in *Gennaria* tra zona apicale a cellule piccole e zona sottostante a cellule grandi. I dosaggi del DNA hanno rivelato nel corpo embrionale ormai quiescente chiare differenze tra nucleo e nucleo. Questi dati e una certa differenza di dimensione nei diversi nuclei indicano che anche in questa specie si verifica qualche poliploidizzazione, di dimensioni però piuttosto limitate;
- 4) la colorazione con jodo-joduro ha rivelato che sia nell'embrione, sia nel sospensore si formano dei granuli d'amido, ma in misura molto limitata. Maggior quantità di amido si accumula nelle pareti dell'ovulo e nelle zone placentari dell'ovario.

CONCLUSIONI

I dati più significativi emersi dall'analisi embriologica sono dunque:

a) per *Gennaria diphylla*: sviluppo normale del gametofito femminile ed evoluzione dello zigoto in un tipico proembrione formato da un corpo globoso e un sospenditore filiforme; la cellula terminale del sospenditore esce dal micropilo rigonfiandosi fortemente.

Quanto alle modalità dell'embriogenesi, nelle linee generali si ha concordanza con i lavori più classici relativi alle Orchidee dei generi vicini alla specie qui esaminata, cioè con i lavori di TREUB (1879), di DUMÉE (1910), con quanto riportato sul trattato di JOHANSEN (1950), e con i recenti lavori di VEYRET (1955, 1956a,b,c, 1965 e di GUIGNARD (1975). Da segnalare soltanto il tipo di sviluppo sopra citato del sospenditore, dato che questo nelle orchidee è molto diverso da specie a specie (SCHNARF, 1931).

Durante lo sviluppo del corpo del proembrione le cellule della regione centrale e basale aumentano le loro dimensioni rispetto a quelle della regione apicale (cioè calazale) e ingrandiscono il loro nucleo; in questi nuclei voluminosi va aumentando anche la quantità di DNA. Il limite tra queste due regioni è abbastanza distinto. Una poliploidizzazione durante lo sviluppo delle orchidee è stata già rilevata da ALVAREZ (1968) per *Vanda* col raggiungimento di valori molto rilevanti, ma il dato si riferisce ad uno stadio successivo alla germinazione.

Durante l'embriogenesi le cellule del tegumento dell'ovulo in *Gennaria* si distendono e si costruiscono nella loro parete un caratteristico ispessimento lignificato a rete. Granuli d'amido vanno accumulandosi nel corpo del proembrione e nella prima fase di vita del sospenditore.

b) per *Barlia robertiana*: sviluppo del gametofito femminile di tipo normale; embriogenesi con le caratteristiche già rilevate da VEYRET (1955); sospenditore filiforme che solo talvolta emerge con l'estremità dal micropilo; assenza di quella distinzione tra zona apicale dell'embrione e zona sottostante chiaramente riscontrata in *Gennaria*; una certa variabilità nelle dimensioni delle cellule e dei nuclei e nella quantità di DNA, che indicano il verificarsi di una, se pur limitata, poliploidizzazione.

RIASSUNTO

Il decorso dello sviluppo nelle varie fasi della riproduzione nelle Orchidee presenta caratteristiche particolari di grande interesse biologico. In que-

sto lavoro si prende in esame il decorso dei vari stadi di sviluppo del gametofito femminile e l'embriogenesi di due specie: *Gennaria diphylla* e *Barlia robertiana*.

Sui nuclei delle cellule del proembrione di queste due specie sono stati fatti inoltre preliminari dosaggi citofotometrici della quantità di DNA presente in essi; si è potuto così rilevare che sia in *Gennaria* che in *Barlia* si ha una variazione della quantità di materiale genetico, per cui si può pensare ad una poliploidizzazione, anche se in quest'ultima specie in misura molto limitata.

SUMMARY

The process of the development in the several phases of the Orchid reproduction shows peculiar features of a great biological interest. The author has examined the development of the various stages of the female gametophyt and the embryogenesis of two species: *Gennaria diphylla* e *Barlia robertiana*.

Moreover, she has done preliminary cytophotometric dosages on the quantity of DNA being in the nucleus of the proemrbyo cells of these two species and has noticed that both in *Gennaria* and in *Barlia* there is a variation in the quantities of the genetyc material; therefore, it's quite possible to presume a polyploidization, even though to a very limited point in this last species.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ M. R., 1965 - A histochemical study of embryo development in *Vanda* (*Orchidaceae*). *Caryologia*, 18: 251-261.
- ALVAREZ M. R., 1968 - Quantitative changes in nuclear DNA accompanying post germination embryonic development in *Vanda* (*Orchidaceae*). *Amer. J. Bot.*, 55 (9): 1036-1041.
- CHAMPAGNAT M., 1971 - Recherches sur la multiplication végétative de *Neottia nidus-avis* Rich. *Ann. Sci. Nat. Bot. Paris*, 12: 209-248.
- DUMÉE M. P., 1910 - Quelques observations sur l'embryon des *Orchidées*. *Bull. Soc. Bot. France*, 57: 83-87.
- GOEBEL K., 1913 - Organographie der Pflanzen. Jena, 382-383.
- GUIGNARD J. L., 1975 - Embryogénie et classification embryogénique. *Bull. Soc. Bot. France*, 122: 281-294.
- JOHANSEN D. A., 1950 - Plant Embryogeny of the Spermatophyta. Waltham. *Chronica Bot. Comp.*: 253-265.
- SCHNARF K., 1931 - Vergleichende Embryologie der Angiospermen. Berlin: 273-279.
- TREUB M., 1879 - Notes sur l'embryogénie de quelques *Orchidées*. *Verh. Kon. Akad. Amsterdam, Natuurk.*, 19: 1-50.

- VEYRET Y., 1955 - Embryogénie des *Orchidacées*. Développement de l'embryon chez *Orchis longibracteata* Biv., *C. R. Acad. Sc.*, 241: 1828-1831.
- VEYRET Y., 1956a - Embryogénie végétale, *Orchidacées*, Le lois du développement chez le *Neottia nidus-avis* Rich. *C. R. Acad. Sc.*, 243: 1549-1551.
- VEYRET Y., 1956b - Embryogénie des *Orchidacées*. Le lois du développement chez le *Goodyera repens* R. Br. *Bull. Soc. Bot. France*, 103: 577-581.
- VEYRET Y., 1956c - Embryogénie des *Orchidacées*. Développement de l'embryon chez l'*Orchis laxiflora* Lam. *Bull. Soc. Bot. France*, 103: 120-126.
- VEYRET Y., 1965 - Comparative embryogenesis and blastogenesis in *Orchidaceae* monandre. *Mem. Orstom., Office Rect. Sci. Tech. Outre Mer.* 12: 1-106. Paris.