

УДК 582.475.4.630*182:581.321.2

В.П. КОБА

Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр УААН, Ялта
e-mail: nbs1812@ukr.net

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ МОРФОГЕНЕЗА И ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЫ *PINUS PALLASIANA D. DON.*



Проведены исследования морфогенеза пыльцы *Pinus pallasiana D. Don.* в естественных насаждениях на южном макросклоне Главной гряды Крымских гор. Описаны некоторые нарушения формирования пыльцевого зерна и пыльцевых трубок при прорастании пыльцы *in vitro*. Даны хронологическая характеристика динамики аномалий развития мужского гаметофита *P. pallasiana*.

© В.П. КОБА, 2004

Введение. Развитие мужской генеративной сферы – один из наиболее важных этапов репродуктивного цикла высших растений. Количества и качество пыльцы являются интегральными показателями, в той или иной степени отражающими результативность микроспоро- и гаметофитогенеза [1–4]. В настоящее время на фоне общих природных явлений все большее значение приобретает техногенное загрязнение, уровень и негативные последствия которого в масштабах обширных лесных территорий не всегда удается своевременно и однозначно определить [5]. В этой связи проблемы текущего состояния насаждений *P. pallasiana*, обусловленные полным отсутствием или крайне слабым развитием процессов семенного воспроизводства на территориях горельников, диктуют необходимость детального исследования отдельных этапов репродуктивного цикла и, в частности, специфики формирования мужских генеративных структур. Особое значение в этом плане приобретают долгосрочные наблюдения, которые позволяют дать хронологическую оценку развития процессов репродукции в связи с динамикой факторов внешней среды, определить основные тенденции негативных изменений в формировании репродуктивных структур.

Материал и методы. Изучение процессов развития мужских генеративных структур *P. pallasiana* проводили в период с 1990 по 2001 гг. (за исключением 1993 г.) на постоянных пробных площадях, заложенных по трем гипсометрическим профилям в восточной (район пос. Никита, площади № 1, 2, 3), центральной (район хребта Иограф, площади № 4, 5, 6) и западной (район пос. Алупка, площади № 7, 8, 9) части наиболее крупного массива лесов на южном макросклоне Главной гряды Крымских гор, простирающегося от пос. Запрудное до Симеиза.

Пробные площади размещены в высотных поясах 400, 600 и 900 м над уровнем моря и расположены в формациях *Pinus pallasiana*, ассоциациях *Brachypodium rupestre* для площадок нижнего и среднего пояса и ассоциациях *Brachypodium rupestre + Asphodeline taurica*, *Physospermatum danae + Laser trilobum*, *Polygonatum odoratum* для площадок верхнего пояса. Закладку пробных площадей проводили, используя общепринятые в лесоводстве и геоботанике методы [6, 7].

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2004. № 3

Хронологическое сложение за прохождением микроспоро- и гаметофитогенеза осуществляли на временных ацетокарминовых препаратах [8]. Материал для анализа собирали в весенний период по десяти модельным деревьям на каждой пробной площади с интервалом 3–4 дня, в период активизации процессов — через 1–2 дня. Результативность развития мужского гаметофита определяли прорациванием пыльцы на двух культуральных средах: 10%-ный раствор сахарозы и дистиллированная вода [8–10]. Изучаемые объекты более детально анализировали на постоянных препаратах-мазках, приготовленных по методике, которая разработана в Никитском ботаническом саду [11]. Просмотр препаратов и фотографирование объектов проводили, используя микроскоп «Биолам-И».

Результаты исследований и их обсуждение. Сравнительный цитоэмбриологический анализ мейоза по пробным площадям показал, что в целом у *P. pallasiana* в горном Крыму он проходит типично для видов рода *Pinus* [12–14]. Однако сроки наступления и продолжительность отдельных фаз характеризуются некоторыми различиями в связи с высотой местопроизрастания, что, очевидно, определяется особенностями динамики климатических факторов в горной местности. Наиболее растянута по времени ранняя профаза. Для нижнего и среднего поясов этот период в среднем составил 9–11 дней, для верхнего — 12–15 дней. Последующие стадии первого и второго деления мейоза в нижнем и среднем поясах проходят в течение 2–3 дней, в верхнем — 4–5 дней. Особенно быстро проходит второе деление мейоза. Тетрады микроспор распадаются в течение 2–3 дней.

В нижнем поясе начало мейоза наблюдали на 3–4 дня раньше, чем в среднем, и на 7–10 дней раньше, чем в верхнем. Завершался мейоз в насаждениях нижнего пояса на 4–5 дней раньше в сравнении с насаждениями среднего пояса и на 12–16 дней — в сравнении с насаждениями верхнего пояса. Таким образом, наиболее высокий градиент климатических факторов, оказывающих непосредственное влияние на сроки начала и продолжительность мейоза *P. pallasiana* в условиях южного макросклона Главной гряды Крымских гор, наблюдается в пределах высот 600–900 м над уровнем моря.

По мнению многих исследователей, период мейоза наиболее уязвим и восприимчив к воздействию внешних факторов [15–18]. Серьезные нарушения могут вызвать резкие колебания температуры воздуха в период прохождения мейоза [19]. В ходе развития материнских клеток микроспор *P. pallasiana* происходили различного рода нарушения. В первой профазе достаточно часто отмечалась дегенерация микроспороцитов, в последующем содержимое таких клеток частично или полностью лизировало.

Различные виды нарушений мейоза и в постмейотический период (который также достаточно уязвим к действию экстремальных климатических факторов [20, 21]) оказывают влияние на качество зрелой пыльцы. Морфологически это проявляется в виде формирования очень мелких и крупных пыльцевых зерен, аномального количества летательных мешков: их полная редукция или образование одного, трех и четырех (рис. 1). На стадии первого митотического деления мужского гаметофита встречались зерна даже с шестью летательными мешками.

Формирование мужского гаметофита после распада тетрад начинается с деления ядра микроспоры. Продолжительность первого деления примерно одинакова по всем высотным поясам и составляет 9–10 дней. Оно завершается образованием инициали антеридия и первой проталлиальной клетки, которая вскоре дегенерирует. Второе деление мужского гаметофита происходит через 5–6 дней после завершения первого. В процессе второго деления инициальная антеридия делится, формируя антеридиальную и вторую проталлиальную клетку, которая также дегенерирует, однако в отличие от первой вторая проталлиальная клетка, прижатая к экзине оболочки пыльцевого зерна, вполне четко просматривается на препаратах зрелой пыльцы. Третье деление мужского гаметофита, в результате которого антеридиальная клетка делится, образуя генеративную и сифоногенную клетки, и формируется 4-клеточное пыльцевое зерно, происходит вскоре после второго деления за 2–3 дня до начала вылета пыльцы.

Из аномалий формы и размеров пыльцы следует выделить образование нарости на экзине, которые расположены непосредственно над летательными мешками (рис. 1, 2). Особый

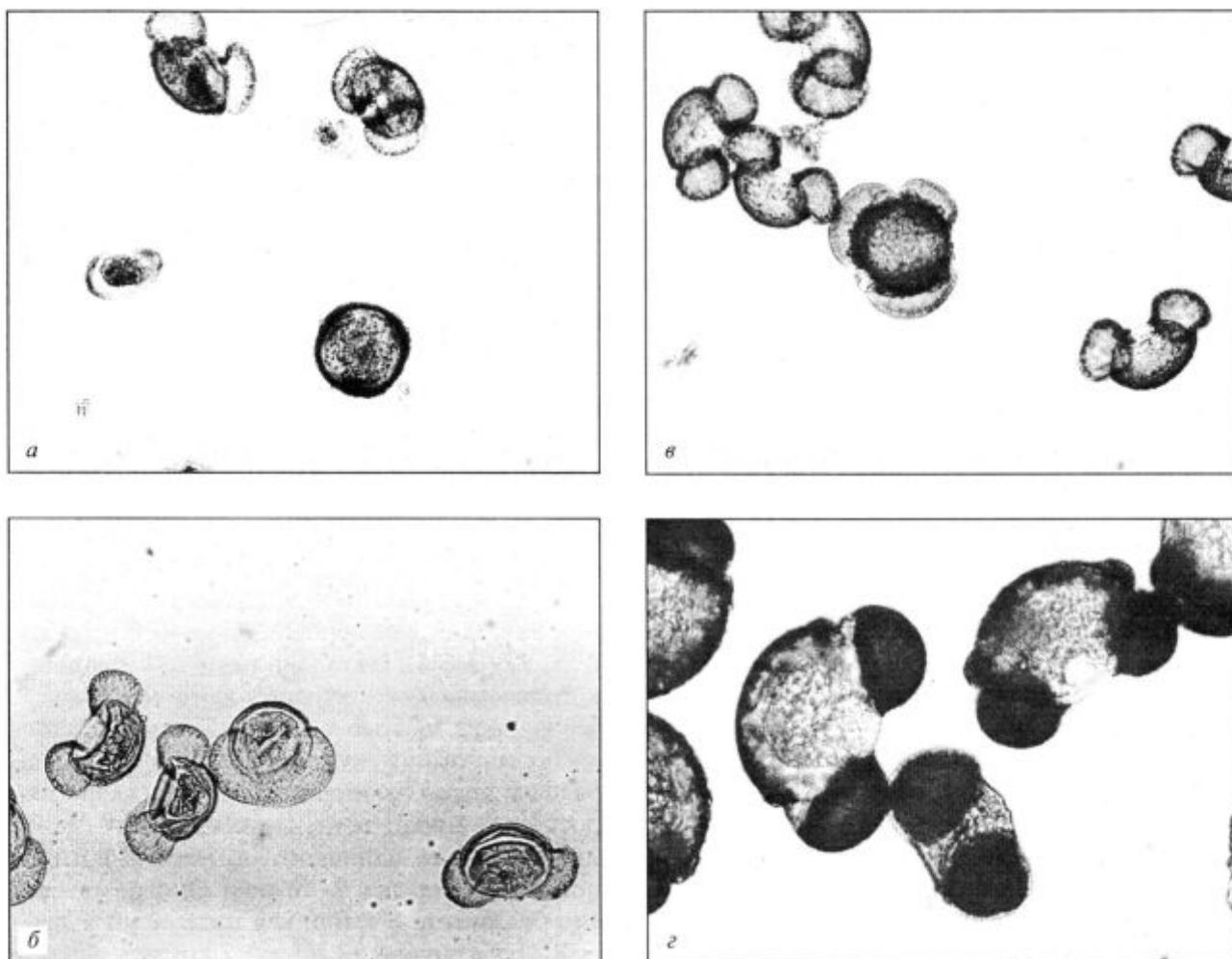


Рис. 1. Различные виды нарушений структуры и формы пыльцевого зерна *P. pallasiana*: а — редукция летательных мешков; б — формирование одного летательного мешка; в — формирование трех летательных мешков; г — наросты на экзине, ×600

интерес представляет формирование двойных пыльцевых зерен, когда внешне нормальное пыльцевое зерно имеет внутреннюю перегородку, которая делит его на две части. Такого типа аномалии описаны для ели [22] и некоторых гибридов пиона [23]. Наличие перегородки заметно уже на стадии первого проталлиального деления. В зрелой пыльце перегородка может проходить через все пыльцевое зерно (тело и летательные мешки) или только через тело пыльцевого зерна. Остаточным явлением существования перегородки на более ранних этапах развития мужского гаметофита или ее неполной выполнности может служить наличие ободка по периметру пыльцевого зерна в месте соединения перегородки с внешними оболочками пыльцевого зерна (рис. 2).

Образование пыльцевых зерен с перегородкой, по нашему мнению, обусловлено нарушением на стадии формирования тетрад микроспор. В процессе развития таких двойных пыльцевых зерен одна или обе части их содержимого могут полностью лизировать (рис. 2, г). Был выявлен также факт наличия перегородки у пыльцы с четырьмя летательными мешками, которая проходила через все тело аномального пыльцевого зерна (рис. 3).

Во время прорастания пыльцы *P. pallasiana* на искусственной питательной среде наблюдалось известное для многих голосеменных явление: ветвление пыльцевых трубок [9, 10, 12, 24]. Предполагается, что у голосеменных физиологико-биохимический механизм хемотропического привлечения пыльцевых трубок

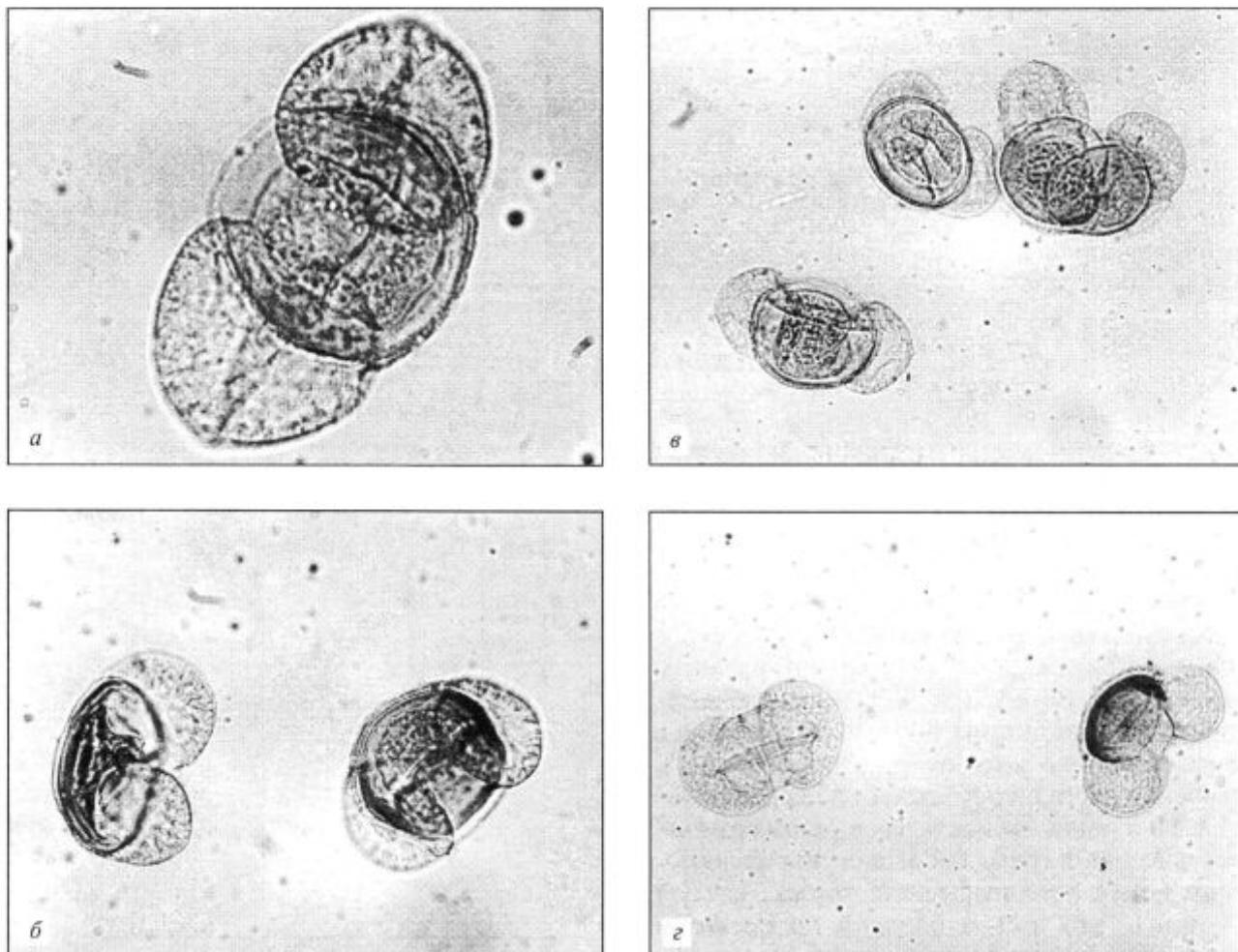


Рис. 2. Двойные пыльцевые зерна: а — перегородка проходит через все пыльцевое зерно, $\times 1200$; б — через тело пыльцевого зерна, $\times 500$; в — ободок как остаточная структура перегородки; г — лизис внутренних структур, $\times 350$

к архегониям развит сравнительно слабо, вследствие чего пыльцевая трубка, не испытывая направляющего воздействия женских органов, образует разветвления. Ветвление пыльцевых трубок, будучи признаком примитивной организации мужского гаметофита, имеет вместе с тем приспособительное значение. Разветвления трубок служат гаусториями, мужской гаметофит питается за счет их лизирующей и всасывающей деятельности, таким образом достигается увеличение общей поверхности трубки, повышается уровень поступления питательных веществ [24, 25]. Ветвление пыльцевых трубок при прорастании пыльцы *in vitro* может также быть связано со спецификой влияния среды проращивания [14].

Для голосеменных типичным является дихотомическое ветвление, различные же варианты многократного ветвления пыльцевых трубок по типу «оленых рогов» описаны для пыльцы сосны, подвергшейся воздействию ионизирующего излучения [26]. Такой же тип ветвления был отмечен при прорашивании пыльцы *P. sylvestris* L., собранной в древостоях в районе аварии на Чернобыльской АЭС [27]. Ветвление пыльцевых трубок по типу «оленых рогов» (рис. 4, а) при прорашивании пыльцы *P. pallasiана* *in vitro* наблюдалось довольно часто, по некоторым деревьям количество таких трубок достигало 60–70 %.

В норме для сосны пыльцевая трубка образуется с вентральной стороны пыльцевого зерна в процессе роста внутреннего слоя ее оболочки

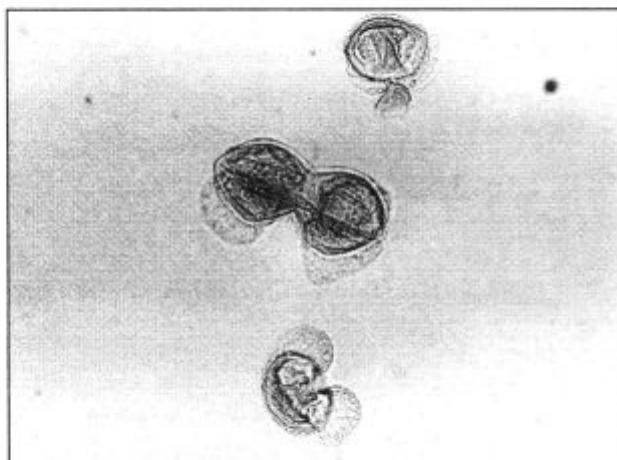


Рис. 3. Перегородка, проходящая через тело аномального пыльцевого зерна, $\times 180$

(интины) через пору в экзине [28]. В литературе по некоторым видам сосны описаны случаи дорзовентрального прорастания пыльцевого зерна, которые относят к редким аномальным явлениям [9, 10, 29]. В период наших наблюдений факт прорастания пыльцы *P. pallasiana* с двух сторон не являлся редкостью (рис. 5), особенно часто он наблюдался в первой половине 90-х годов. Не исключая в целом возможность влияния среды проращивания на дорзовентральный рост пыльцевых трубок, следует отметить, что весьма близкий по внешним признакам характер прорастания пыльцевых трубок наблюдался у явно аномальных пыльцевых зерен, имевших три, четыре летательных мешка (рис. 6).

Количество пыльцевых зерен с двумя трубками характеризуется определенной хронологической осцилляцией и проявляет некоторую связь местопроизрастания древостоев с высотой над уровнем моря. Наиболее часто пыльцевые зерна с двумя пыльцевыми трубками отмечались в первой половине 90-х годов, особенно в этом плане следует выделить 1992 и 1995 гг., когда среднее их количество от общего объема составляло 40–50 % (рис. 7). К концу десятилетия этот показатель снизился до 2–6 %. В течение периода наблюдений в образцах пыльцы, собранной в насаждениях нижнего пояса, встречаемость данных аномалий была выше, что может быть связано с близостью урбанизированных территорий и, как следствие, повышением уровня техногенного загрязнения.

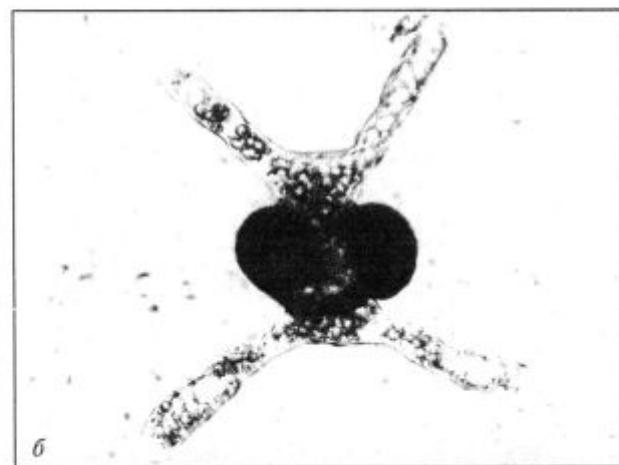
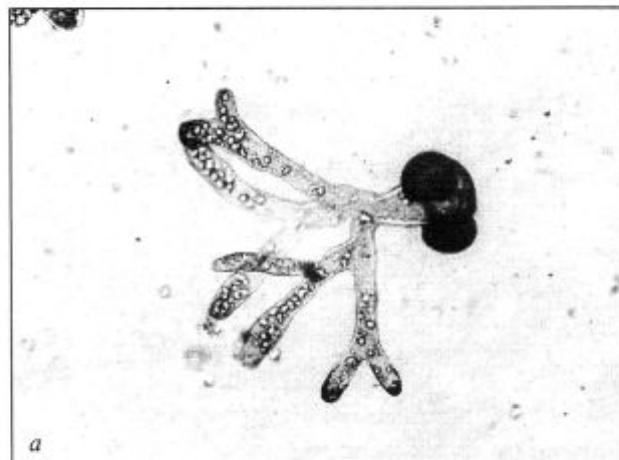


Рис. 4. Аномалии пыльцевых трубок: а — ветвление по типу «оленевых рогов», $\times 230$; б — прорастание с вентральной и дорзальной сторон пыльцевого зерна, $\times 400$

Пыльцевые зерна, формирующие при прорастании две пыльцевые трубы, морфологически мало чем отличаются от нормальной пыльцы; обычно они выделяются несколько большими размерами. Дорзовентральное прорастание мелкой пыльцы не наблюдалось. Набухание, начало роста и дальнейшее увеличение длины пыльцевых трубок, растущих в разные стороны, происходило почти одновременно и с одинаковой скоростью. После прекращения роста такие пыльцевые трубы имели примерно одинаковую величину, незначительно меньше, чем у нормальной пыльцы.

В развитии и росте каждой из двух пыльцевых трубок проявлялись все особенности и свойства, присущие одиночным трубкам: они могли расти прямо, образовывать дихотоми-

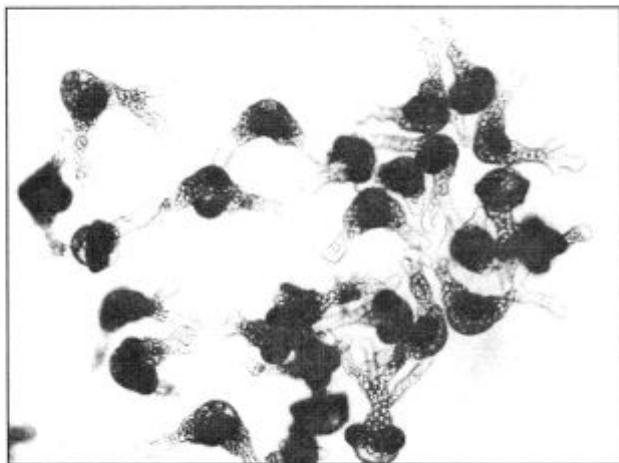


Рис. 5. Пыльцевые зерна с двумя пыльцевыми трубками, $\times 120$

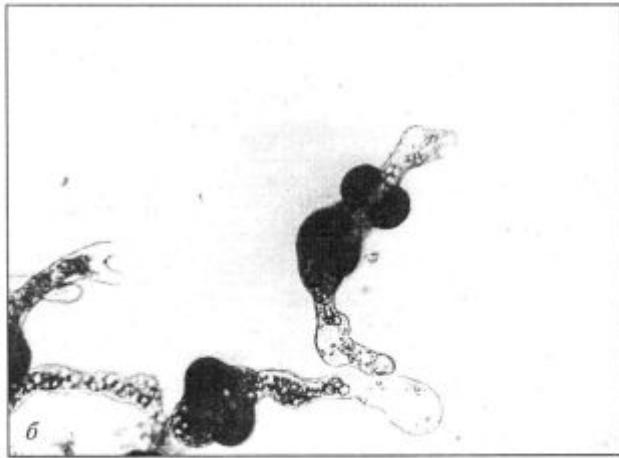
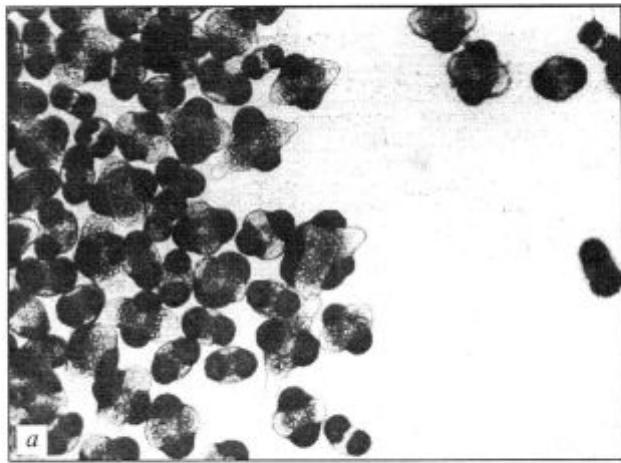


Рис. 6. Формирование двух пыльцевых трубок у пыльцы: а — с тремя, $\times 140$; б — с четырьмя летательными мешками, $\times 180$

ческое ветвление (рис. 4, б) или многократное ветвление в виде «оленых рогов» с двумя, тремя и даже шестью отростками.

Цитоэмбриологический анализ пыльцы, сформировавшей две пыльцевые трубы, в некоторых случаях позволил установить выход двух сифоногенных ядер в противоположные пыльцевые трубы. Обычно в таких пыльцевых зернах имелась внутренняя перегородка. Очевидно, в данном случае дорзовентальное прорастание пыльцы является следствием биспоризма, когда под одной оболочкой пыльцевого зерна находятся два мужских гаметофита. Однако более часто наблюдались полное отсутствие ядер сифоногенной клетки в пыльцевых трубках или выход ядра сифоногенной клетки в одну из двух пыльцевых трубок.

Поэтому наряду с фактами биспоризма рост двух трубок может быть обусловлен нарушением деления мужского гаметофита. Возможно образование двойных ядер сифоногенной клетки по типу дикариона, когда два ядра в виде полусфер прилегают друг к другу, образуя одно целое. Такое образование цитологически очень сложно определить, его можно наблюдать непосредственно в момент выхода в пыльцевую трубку. Подобные структуры могут способствовать росту двух пыльцевых трубок, оставаясь в пределах оболочки пыльцевого зерна, в силу равновеликого действия друг на друга их двух составляющих. В тех случаях, когда одна из составляющих проявляет большую активность, возможен выход двойного ядра в одну из пыльцевых трубок.

Высокая частота встречаемости двойных пыльцевых трубок, а также синхронность изменения их количества по пробным площадям позволяет характеризовать это явление как адаптивный признак, увеличивающий возможность реализации индивида, наиболее соответствующего конкретным условиям. Об этом свидетельствует то, что двойных пыльцевых трубок при прорашивании на дистиллированной воде формируется в 5–7 раз меньше, чем при прорашивании на 10%-ном растворе сахарозы. При этом наблюдается фенотипическая дифференциация — одни деревья производят пыльцу, активность прорастания которой с двух сторон примерно одинакова как на дистилляте, так и на 10%-ном растворе сахарозы; пыльца других деревьев в условиях

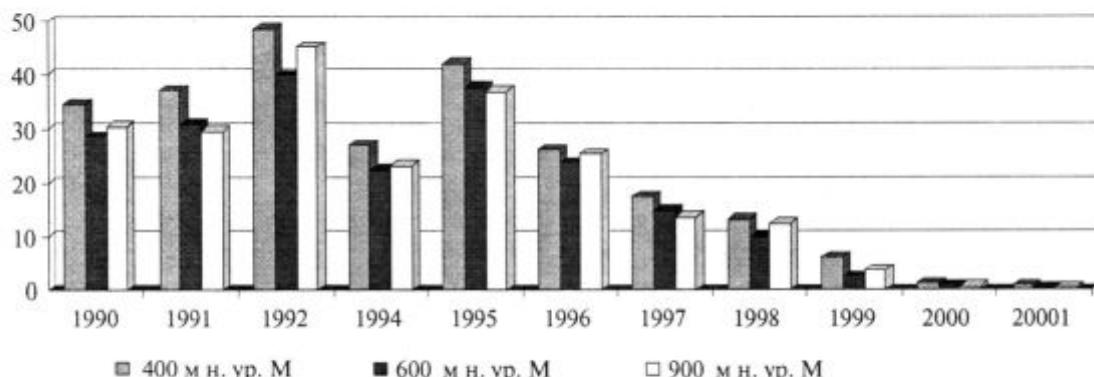


Рис. 7. Количество пыльцевых зерен, формирующих две пыльцевые трубы, по годам и в связи с высотой над уровнем моря

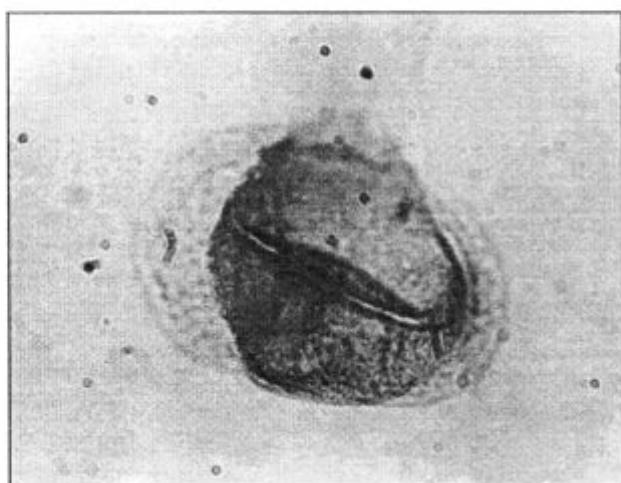


Рис. 8. Формирование одной пыльцевой трубы у пыльцевого зерна, имеющего внутреннюю перегородку, $\times 900$

среды, лишенной питательных веществ, формирует незначительное количество двойных трубок.

При цитоэмбриологическом исследовании пыльцы, проросшей на дистиллированной воде, были выявлены случаи, когда пыльцевое зерно, имеющее внутреннюю перегородку, формировало одну пыльцевую трубку. Содержимое второй половины при окрашивании не проявляло каких-либо четких структур (рис. 8). Таким образом, можно предположить, что в данном случае на уровне гаметофита проявилось действие естественного отбора, когда в экстремальной ситуации крайне низкого содержания питательных веществ в среде прорашивания реализовался один из двух — наиболее толерантный мужской гаметофит, другой же

лизировал и, очевидно, был использован в трофических целях.

Выходы. При изучении особенностей развития и формирования пыльцы *P. pallasiana* в условиях естественного прорастания были выявлены различные виды нарушений: полная редукция или образование одного, трех, четырех летательных мешков; наросты на экзине, симметрично расположенные над летательными мешками; двойные пыльцевые зерна, имеющие внутреннюю перегородку. Пыльца *P. pallasiana* при пророщивании на искусственной питательной среде достаточно часто формирует пыльцевые трубы с многочленным ветвлением по типу «оленых рогов», по некоторым образцам пыльцы их количество достигало 60–70 %. Динамика встречаемости дорзовентрального прорастания пыльцы *P. pallasiana* в древостоях южного макросклона Главной гряды Крымских гор характеризуется хронологической осцилляцией и проявляет определенную связь с высотой местопроизрастания. Формирование двух пыльцевых трубок, сентральной и дорзальной сторон пыльцевого зерна, возможно, является адаптивным признаком, обеспечивающим в экстремальных условиях реализацию наиболее толерантного фенотипа.

SUMMARY. Investigation of *Pinus pallasiana* D. Don. pollen morphogenesis in natural forest plantations of the southern slope of the Main ridge of Crimean mountains has been carried out. Some abnormalities of pollen grain and pollen tube formation in the course of pollen germination *in vitro* are described. The dynamics of developmental abnormalities of *P. pallasiana* male gametophyte is characterized.

РЕЗЮМЕ. Проведено дослідження морфогенезу пилку *Pinus pallasiana* D. Don. у природних насадженнях на південному макросхілі Головної гряди Кримських гір. Описано деякі порушення формування пилкового зерна і пилкових трубок при проростанні пилка *in vitro*. Дано хронологічну характеристику динаміки аномалій розвитку чоловічого гаметофіта *P. pallasiana*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ругузов И.А. Анализ репродукции сосны крымской и составление схемы цикла репродукции этого вида в Крыму // Летопись природы заповедника «Мыс Мартыян». — Ялта, 1987. — № 14. — С. 142—161.
2. Ругузов И.А., Кузнецов С.И. Развитие мужского гаметофита кедра атласского // Бюл. ГБС. — 1976. — Вып. 101. — С. 94—97.
3. Ругузов И.А., Склонная Л.У. Эколо-генетические закономерности адаптации хвойных растений Крыма // Бюл. Никит. бот. сада. — 1988. — № 104. — С. 6—25.
4. Сунцов А.В. Микроспорогенез и качество пыльцы у сосны обыкновенной в Центральной Туве // Плодоношение лесных пород Сибири. — Новосибирск : Наука, 1982. — С. 60—69.
5. Смит У.И. Лес и атмосфера. — М.: Прогресс, 1985. — 430 с.
6. Анучин Н.П. Лесная таксация. — М.: Лесная промышленность, 1982. — 512 с.
7. Воробьев Д.В. Методика лесотипологических исследований. — Киев : Урожай, 1967. — 388 с.
8. Паушева З.П. Практикум по цитоэмбриологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
9. Котелова Н.В. Проращивание пыльцы на искусственных средах и способы хранения пыльцы сосны обыкновенной // Науч.-техн. информация МЛТИ. — 1956. — № 23. — С. 13—20.
10. Размолов В.П. О проращивании и хранении пыльцы некоторых голосеменных растений // Бюл. ГБС. — 1964. — Вып. 52. — С. 79—87.
11. Кузнецов С.И., Ругузов И.А. Методические рекомендации по фенотипической оценке хвойных при интродукции на Юге СССР. — Ялта, 1976. — 20 с.
12. Мошкович А.М. Репродуктивное развитие сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и сосны черной (*P. nigra* Arn.) в Молдове. Мужской гаметофит после опыления. — Кишинев : Штиинца, 1991. — С. 40—58.
13. Подгорный Ю.К., Ругузов И.А. Особенности микроспорогенеза и развития мужского гаметофита сосны крымской в связи с семеношением и жизнеспособностью популяций // Бюл. Никит. бот. сада. — 1979. — Вып. 1 (38). — С. 21—25.
14. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных : Физиологические аспекты. — Новосибирск : Наука, 1990. — 157 с.
15. Бессонова В.П. Состояние пыльцы как показатель загрязнения среды тяжелыми металлами // Экология. — 1992. — № 4. — С. 45—50.
16. Буторина А.К., Мурая Л.С., Машкина О.С., Высоцкий А.А. Новый тип мейотической мутации у сосны // Генетика. — 1985. — № 1. — С. 103—111.
17. Козубов Г.М. Биология плодоношения хвойных на Севере. — Л.: Наука, 1974. — 133 с.
18. Константинов А.В. Мейоз. — Минск : Изд-во БГУ, 1971. — 179 с.
19. Яковлев А.В. О влиянии низких температур на микроспорогенез сосны обыкновенной // Лесоведение. — 1978. — № 6. — С. 51—55.
20. Артемов В.А. Жизнеспособность пыльцы // Эколо-биологические основы повышения продуктивности лесов европейского Севера. — Л.: Наука, 1981. — С. 185—212.
21. Некрасова Т.П. Влияние температуры воздуха на формирование пыльцы хвойных пород // Лесоведение. — 1976. — № 6. — С. 37—43.
22. Pollock J.B. Variation in the pollen grain of *Picea excelsa* // Amer. Natur. — 1906. — 49. — P. 253—286.
23. Циунович О.Д. Зависимость размеров микроспор от числа хромосом в их ядрах // Вестн. МГУ. Биология. — 1970. — № 5. — С. 45—48.
24. Цингер Н.В., Размолов В.П. О двух основных тенденциях редукции мужского гаметофита голосеменных в филогенезе // Половая репродукция хвойных : Материалы I Всесоюз. симпоз. — Новосибирск : Наука, 1973. — Ч. 1. — С. 34—45.
25. Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. — М.: Наука, 1976. — 508 с.
26. Mergen F., Johansen T.S. Effect of ionizing radiation on microsporogenesis in *Pinus rigida* Mill. // Radiat. Bot. — 1963. — 3, № 4. — P. 321—331.
27. Артемов В.А., Козубов Г.М., Остапенко Е.К. Репродуктивные процессы // Радиационное воздействие на хвойные леса в районе аварии на Чернобыльской АЭС. — Сыктывкар, 1990. — С. 90—126.
28. Singh K. Embryology of Gymnosperms. — Berlin-Stuttgart, 1978. — 302 р.
29. Николаева А.И. Жизнеспособность пыльцы кедра сибирского в условиях Западного Саяна // Лесоведение. — 1974. — № 3. — С. 59—63.

Поступила 04.11.03