

Список литературы

- Кашин А.С., Березуцкий М.А., Кочанова И.С., Добрыничева Н.В. Особенности системы семенного размножения в популяциях некоторых видов Asteraceae в связи с их толерантностью к антропогенным местообитаниям // Поволж. эколог. журн. 2006. №2/3. С.139–146.
- Кашин А.С., Березуцкий М.А., Кочанова И.С., Добрыничева Н.В., Полянская М.В. Основные параметры системы семенного размножения в популяциях некоторых видов Asteraceae в связи с действием антропогенных факторов // Бот. журн. 2007. Т.92, №9. С.1408–1427.
- Куприянов П.Г. Способ приготовления препаратов зародышевых мешков // Бюл. изобр. 1982. №14. С.7.
- Ноглер Г.А. Гаметофитный апомиксис // Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии. М., 1990. Т.2. С.39–91.
- Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктических растений во флоре цветковых растений СССР. Саратов, 1978. 224 с.
- Herr J.M. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms // Amer. J. Bot. 1971. Vol.5.

УДК 581.3

КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН
В ЗРЕЛЫХ ПЫЛЬНИКАХ ЕЖИ СБОРНОЙ *DACTYLIS GLOMERATA* L.

Н.Н. Круглова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН,
450054, г. Уфа, пр. Октября, 69; e-mail: kruglova@anrb.ru

Светлой памяти П.Г. Куприянова
посвящается

Качество зрелых пыльцевых зерен, напрямую определяющее их способность к оплодотворению, – важнейший показатель репродуктивной биологии растений, а значит, стратегии жизни особи и популяции в целом.

Развитие пыльцевых зерен оценивается как функционально-адаптивный процесс, в конечном счете обеспечивающий надежность воспроизводства популяций амфимиктично размножающихся растений. Нарушение этого процесса в ответ на воздействие неблагоприятных внешних факторов среды может быть использовано для оценки экологической пластичности и толерантности репродуктивных механизмов растений. Кроме того, качество пыльцевых зерен связано с понятием «реальная семенная продуктив-

ность» (количество полноценных семян особи) – важнейшим показателем оценки систем семенного размножения (Левина, 1981). Таким образом, важность изучения качества пыльцевых зерен очевидна.

Этот показатель особенно важен для получения качественных семян при введении в культуру ежи сборной как кормового растения. Такого рода работы проводятся в лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН по договору о сотрудничестве с Башкирским НИИ СХ РАСХН (г. Уфа). Ранее был детально изучен морфогенез пыльника этого злака от заложения археспория до зрелой структуры (Круглова, Зайцев, 2005). Цель данной работы – дать качественную оценку пыльцевых зерен в зрелых пыльниках ежи сборной.

Материал и методика

Объектом исследования послужила ежа сборная *Dactylis glomerata* L. – представитель семейства Мятликовых (Злаков), произрастающая в естественных условиях по всей территории Ботанического сада Уфимского НЦ РАН. Сбор материала проводили в вегетационные сезоны 2007–2008 гг. Отбирали 30 растений, имеющих зрелые пыльники (фенофаза цветения).

Согласно предварительным данным (Круглова, Зайцев, 2005), пыльники одной стадии развития находятся в цветках колосков средней трети соцветия ежи сборной, поэтому от каждого растения отбирали по 30 зрелых пыльников из средней трети соцветия. Из них 20 пыльников фиксировали в реактиве Чемберлена для их цитологического анализа, 10 пыльников размещали по одному в пенициллиновые пузырьки с притертой крышкой для оценки жизнеспособности пыльцевых зерен.

Фертильность зрелой пыльцы оценивали ацетокарминовым методом (Паушева, 1988) в модификации (Круглова, 2007). Степень аномальности пыльцевых зерен определяли как выраженное в процентах отношение количества аномальных пыльцевых зерен к общему количеству пыльцевых зерен/микроспор в пыльнике. Подсчет количества пыльцевых зерен/микроспор в пыльнике проводили с помощью счетной камеры Фукса-Розенталя по методике (Савченко, 1982).

Определение жизнеспособности пыльцевых зерен вели по методу Транковского (Паушева, 1988), при этом проращивание пыльцы проводили на питательной среде, оптимизированной нами для ежи сборной.

Цитологические препараты просматривали при помощи светового микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) при различном увеличении объектива и фотографировали с применением цифровой камеры «Olympus C-4000» (Nikon Corporation, Japan) с программным управлением.

При анализе развития пыльника и пыльцевых зерен ежи сборной использовали периодизацию развития пыльников злаков (Круглова, 1999).

В литературе при анализе качества пыльцевых зерен широко употребляются термины «жизнеспособность» и «фертильность», а также их антонимы – термины «дегенерация», «стерильность», «дефектность», «аномальность», «неполноценность». В то же время однозначное понимание этих терминов отсутствует. В данной работе эти термины используются в нашем понимании (Круглова, 2006 а, б).

Результаты и их обсуждение

Цитологический анализ зрелых пыльников ежи сборной свидетельствует об определенной асинхронности развития пыльцевых зерен, что в целом характерно для злаков (Поддубная-Арнольди, 1982). В каждом из изученных пыльников одновременно наблюдаются такие последовательные фазы развития, как микроспора, двуклеточное пыльцевое зерно и трехклеточное пыльцевое зерно; при этом абсолютное большинство составляют трехклеточные пыльцевые зерна (73,9 и 78,6% от общего числа микроспор/пыльцевых зерен в 2007 г. и 2008 г. соответственно), тогда как двуклеточные пыльцевые зерна соответственно составили 16,2 и 14,7%, микроспоры – 9,4 и 6,5%.

Микроспора в норме представляет собой клетку с одной крупной центральной вакуолью и ядром, отодвинутым к периферии клетки напротив поры прорастания. В норме зрелое пыльцевое зерно ежи сборной представляет собой систему трех клеток: вегетативной и двух спермиев. Ядро вегетативной клетки амебоидной формы и в большинстве случаев дегенерирует. Оболочка пыльцевого зерна состоит из гладкой экзины (снаружи) и интины; на поверхности экзины наблюдается пора прорастания. В целом ежа сборная как анемофильное растение обладает типичными признаками зрелой пыльцы ветроопыляемых растений (Терехин, 1996).

Пыльцевые зерна нормальной морфологии, содержащие нормально развитые спермии, относятся к категории *фертильных* (способных к оплодотворению) пыльцевых зерен.

Тестом на *жизнеспособность* фертильных пыльцевых зерен служит их прорастание на оптимизированной искусственной питательной среде. Оптимизированной для прорастания зрелых пыльцевых зерен конкретного вида растений следует считать среду такого состава и концентрации компонентов, которая обеспечивает максимальный выход пыльцевых трубок длиной не короче расстояния от поверхности рыльца до семязпочки данного вида растений (Круглова, 2006б). Согласно нашим данным, для ежи сборной такая длина составляет 720 ± 18 мкм. Было выявлено, что оптимальной средой для проращивания зрелой пыльцы ежи сборной является среда, содержащая 15% сахарозы. Именно на среде такого состава отмече-

но максимальное прорастание пыльцевых зерен и максимальное образование пыльцевых трубок длиной не короче 720 мкм. Жизнеспособность фертильных пыльцевых зерен ежи сборной, оцененная таким образом, составила 69,7% (2007 г.) и 75,8% (2008 г.).

В то же время помимо нормальных пыльцевых зерен и микроспор в каждом из просмотренных зрелых пыльниках обнаружены различные аномалии, которые можно объединить в следующие группы: клеточные, ядерные, цитоплазматические.

Клеточные аномалии: двуклеточные структуры, представленные равными клетками (в отличие от двух неравных клеток двуклеточного пыльцевого зерна – генеративной и вегетативной – в норме), многоклеточные структуры; гигантские и мелкие пыльцевые зерна; деформированные пыльцевые зерна (сплюснутые или линзовидные). По нашему мнению, формирование двуклеточных структур можно объяснить действием неблагоприятных метеорологических условий на пыльники, содержащие пыльцевые зерна во время уязвимой для действия внешних факторов фазе микроспоры, вступающей в митоз. Известно, что нарушение поляризации микроспор может быть следствием отрыва микроспор от тапетума под воздействием низких положительных температур и нарушением градиента потока питательных веществ, обуславливающего полярность этих клеток (Романов, 1966). Действительно, согласно метеорологическим данным, первые две декады мая 2007 г., когда микроспоры претерпевали митоз, характеризовались низкими среднесуточными температурами воздуха. Низкие положительные температуры могли вызвать и деформацию пыльцевых зерен (их сплюснутость и линзовидность), как это показано в работе (Куприянов, 1983). Аномалии, проявляющиеся в образовании многоклеточных структур, выявлены у пшеницы (Батыгина, 1974; 1987). Образование мелкой пыльцы и крупной пыльцы отмечено у многих растений, например кукурузы (Орел, 1972).

Ядерные аномалии как следствие нарушений кариокинеза при митозе микроспор: структуры с двумя равными ядрами (вместо двух неравных ядер в норме), многоядерные структуры, выбросы ядерного материала в цитоплазму, гигантские ядра или микроядра, пыльцевые зерна без ядерного материала (то обстоятельство, что отсутствие ядер – не артефакт, обусловленный их непрокрашиванием ацетокармином, подтверждается прокрашиванием ядер рядом расположенных пыльцевых зерен). Появление ядерных аномалий, по-видимому, тоже объясняется влиянием низких среднесуточных температур (особенно в мае 2007 г.). В литературе формирование многоядерных структур под воздействием низких температур отмечено у кукурузы (Орел, 1972), выбросы ядерного материала при формировании пыльцевых зерен, формирование микроядер и многоядерных

пыльцевых зерен – у вишни при почвенной засухе (Яндовка, 2003). По мнению И.Д. Романова (1966), к формированию пыльцевых зерен без ядерного материала у злаков приводит нарушение связи микроспороцитов с тапетальной пленкой.

Цитоплазматические аномалии: нарушение вакуолизации микроспор и двуклеточного пыльцевого зерна на ранней стадии развития (наличие вместо единой крупной вакуоли множества мелких), сжатие цитоплазмы микроспор и пыльцевых зерен. По мнению Л.И. Орел (1972), нарушения вакуолизации микроспор могут быть следствием разного рода неблагоприятных воздействий. К сжатию цитоплазмы пыльцевых зерен могут приводить пониженные температуры (Куприянов, 1983). По-видимому, и у ежи сборной появление цитоплазматических аномалий тоже объясняется влиянием низких среднесуточных температур в мае 2007 г.

Установлено, что количество аномальных пыльцевых зерен и микроспор в целом составляло 10,4% в 2007 г. и 9,8% в 2008 г. по отношению к общему количеству пыльцевых зерен и микроспор в зрелых пыльниках ежи сборной (таблица).

Количественное содержание аномальных пыльцевых зерен в зрелых пыльниках ежи сборной (на 1 пыльник)

Год исследования	Аномалии						% общего кол-ва аномалий от общего кол-ва ПЗ и М
	3КлПЗ		2КлПЗ		микроспор		
	Кол-во, шт.	% от общего кол-ва ПЗ и М	Кол-во, шт.	% от общего кол-ва ПЗ и М	Кол-во, шт.	% от общего кол-ва ПЗ и М	
2007	26,1±1,3	2,0	52,5±2,6	3,6	69,3±3,5	4,8	10,4
2008	28,7±1,4	1,2	36,7±1,8	2,8	86,4±4,3	5,8	9,8

Примечание. М – микроспора, ПЗ – пыльцевое зерно, 2КлПЗ – двуклеточное пыльцевое зерно, 3КлПЗ – трехклеточное пыльцевое зерно.

Таким образом, в каждом из просмотренных пыльников ежи сборной обнаруживается определенное количество аномальных пыльцевых зерен и микроспор. В этом отношении ежа сборная не является исключением. Многие виды многолетних злаков, даже с высокой репродуктивной способностью, обнаруживают тот или иной процент стерильной пыльцы (Эмбриология цветковых растений, 1994).

Согласно критерию оценки степени дефектности пыльцы (Куприянов, 1983, 1989), показатель до 11% характеризует низкую степень дефектности. Исходя из этого, степень аномальности пыльцевых зерен и микроспор в зрелых пыльниках ежи сборной (10,4% в 2007 г. и 9,8% в 2008 г.) следует считать низким, а морфогенез пыльника ежи сборной – протекающим нормально в изученных условиях.

На качество пыльцы влияют различные факторы. На основании экспериментальных и литературных данных П.Г. Куприянов (1983) дал оценку соотносительной роли различных природных (система размножения, генетические факторы) и антропогенных повреждающих факторов среды на качество пыльцы. По мнению исследователя, практически все параметры внешней среды могут оказывать воздействие на генеративную сферу растений, вызывая нарушения процессов споро-, гаметофито- и гаметогенеза, при этом одни и те же воздействия внешней среды у разных видов (форм, хромосомных рас, генотипов) растений приводят к различным результатам. Таким образом, в реакциях на воздействия внешней среды проявляются биологические свойства видов, в том числе особенности их репродуктивных систем. Возможно, это явление следует рассматривать и как проявление апоптоза – запрограммированной гибели клетки – проблеме, которой в настоящее время в биологии уделяется самое пристальное внимание (Ванюшин, 2001; и др.).

Что касается повреждающего действия факторов внешней среды, то, согласно данным П.Г.Куприянова (1983, 1989), больше всего особей с дегенерировавшей пыльцой будет встречаться в годы, резко отличающиеся по своим условиям от обычных, а также в местообитаниях, сильно измененных или загрязненных в результате хозяйственной деятельности человека. Наши данные подтверждают эти выводы: количество аномалий выше в 2007 г., начало вегетационного сезона которого было менее благоприятным по метеорологическим показателям по сравнению с 2008 г.

По абсолютным показателям больше всего аномалий встречается среди микроспор (см. таблицу). Повышенная чувствительность микроспоры определяется, по нашему мнению, двумя обстоятельствами. Первое – нестабильное предмитотическое состояние клетки. Второе – структурная организация клетки: наличие хорошо развитой центральной вакуоли, занимающей основной объем клетки. Тем самым фазу микроспоры можно расценивать как критическую в развитии пыльцевого зерна ежи сборной.

Таким образом, абсолютное большинство пыльцевых зерен в зрелых пыльниках ежи сборной характеризуется как фертильные (способные к оплодотворению) и абсолютное большинство из них – жизнеспособные (способные прорасти в пыльцевые трубки длиной не короче расстояния от поверхности рыльца до семязпочки). Однако в каждом из просмотренных пыльников ежи сборной обнаруживается определенное количество аномальных пыльцевых зерен и микроспор. Фазу микроспоры можно расценивать как критическую в развитии пыльцевого зерна ежи сборной.

Список литературы

Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. Л., 1974. 206 с.

Батыгина Т.Б. Хлебное зерно. Л., 1987. 103 с.

Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений // Успехи биол. наук. 2001. Т.41, №1. С.3–38.

Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков // Изв. РАН. Сер. Биол. 1999. №3. С.275–281.

Круглова Н.Н. К оценке качества пыльцевых зерен // Бюл. Бот. сада СГУ. Саратов, 2006. Вып.5. С.360–361.

Круглова Н.Н. К репродуктивной биологии злаков: качество пыльцевых зерен // Особь и популяция: стратегии жизни: Материалы IX Всерос. популяц. семинара. Уфа, 2006б. С.135–139.

Круглова Н.Н., Зайцев Д.Ю. Состояние пыльников ежи сборной при различных экологических условиях // Проблемы экологии и охраны техногенного региона. Донецк, 2005. С.33–42.

Круглова Н.Н. Световая микроскопия в биотехнологии растений: Метод. рекомендации. М., 2007. 139 с.

Куприянов П.Г. Соотносительная роль факторов, вызывающих появление дефектных пыльцевых зерен у растений в природе. Саратов, 1983. 133 с.

Куприянов П.Г. Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. Саратов, 1989. 160 с.

Левина Р.Е. Репродуктивная биология семенных растений. Обзор проблемы. М., 1981. 96 с.

Орел Л.И. Цитология мужской цитоплазматической стерильности кукурузы и других культурных растений. Л., 1972. 84 с.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М., 1988. 304 с.

Поддубная-Арнольди В.А. Характеристика семейств покрытосеменных растений по цитозембриологическим признакам. М., 1982. 351 с.

Романов И.Д. Специфические особенности развития пыльцы злаков // Докл. АН СССР. 1966. Т.169, №2. С.456–459.

Савченко Н.И. Пыльцевая продуктивность и производство гибридных семян культурных растений на основе ЦМС // Цитолого-эмбриологические и генетико-биохимические основы опыления и оплодотворения растений. Киев, 1982. С. 41–47.

Терёхин Э.С. Семя и семенное размножение. СПб., 1996. 376 с.

Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Генеративные органы цветка. СПб., 1994. Т.1. 508 с.

Яндовка Л.Ф. Формирование генеративных органов *Cerasus vulgaris* Mill и *C. tomentosa* (Thunb.) Wall в связи с водным режимом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Сыктывкар, 2003. 24 с.