

**ПЕРИОДИЗАЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА ПЫЛЬНИКА
РАСТЕНИЙ РОДА ОСТРОЛОДОЧНИК *OXYTROPIS* DC. (FABACEAE)**

© 2011 А.Е. Круглова

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 16.08.2011

На основании впервые полученных цито-гистологических данных по развитию пыльника интродуцированных растений *Oxytropis* DC. (семейство бобовые) предложена периодизация морфогенеза этой генеративной структуры как сложной интегрированной системы. Данная периодизация может быть использована при проведении экспериментальных исследований интродуцированных растений с целью повышения количества жизнеспособных зрелых пыльцевых зерен.

Ключевые слова: редкие растения, пыльник, морфогенез, *Oxytropis*.

Один из эффективных приемов сохранения, размножения и увеличения численности особей редких и исчезающих видов растений – их интродукция в специализированные питомники [1]. Коллекции интродуцированных редких и исчезающих видов могут стать базой для реинтродукции (репатриации) этих растений в естественные местообитания и тем самым – восстановления природных популяций [26].

Однако хорошо известно, что зачастую у интродуцированных растений нарушается развитие генеративных органов, и особенно восприимчивы к смене природного ареала пыльцевые зерна и пыльник в целом.

В то же время для успешной реинтродукции требуется значительное количество качественных семян интродуцированных растений. Стабильное получение качественных семян интродуцированных растений определяется в том числе и качеством (жизнеспособностью) их зрелой пыльцы, которое во многом зависит от нормального морфогенеза пыльника в целом. Кроме того, количество качественных пыльцевых зерен, безусловно, связано с понятием «реальная семенная продуктивность» – важнейшим показателем оценки систем семенного размножения [21].

Методологическая проблема, связанная с исследованием морфогенеза пыльника интродуцентов, состоит в разработке периодизации развития этого генеративного органа.

Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что исследователи применяют различные периодизации развития пыльника. Абсолютное большинство таких периодизаций основано на цитоморфологических данных (например [29-30]). Предложены периодизации развития спорогенных клеток, базирующиеся на данных биохимических и цитохимических исследований [28-29, 31-2, 36-38, 43-45]. Известны исследования, посвященные морфометрическим (цитометрическим) характеристикам клеток каждой фазы микроспорогенеза и микрогаметогенеза [10, 31-33, 46] и продолжительности этих фаз [18, 41].

Некоторые авторы не приводят четкой периодизации развития пыльника изучаемых растений, указывая лишь на разную степень его зрелости, которая выявляется визуально по окрашиванию: зеленые, желто-зеленые и желтые пыльники (по [18]).

Ряд работ посвящен исследованию регуляции и экспрессии генов в спорогенных клетках пыльников различных (в том числе трансгенных) растений на том или ином этапе их развития, а также изучению промоторных элементов генов пыльцевых зерен [39-42]. Анализ этой интереснейшей проблемы не входит в нашу задачу. Подчеркнем лишь, что в ходе развития пыльцевого зерна – мужского гаметофита, или микрогаметофита – проявляется действие значительного количества генов, а этого вряд ли можно было бы ожидать исходя из кажущейся простоты пыльцевого зерна (дву- или трехклеточная структура).

Таким образом, авторы предложенных периодизаций морфогенеза пыльника представителей различных семейств покрытосеменных, как правило, делают упор на развитие пыльцевых зерен. Периодизаций развития пыльника с учетом состояния стенки его гнезда предложено сравнительно немного (например [6-7, 9, 19, 33-35]). Так, на основании цитоморфологического и цитохимического анализа развития спорогенных клеток и клеток различных слоев стенки гнезда пыльника лилейных С.А. Резникова [28] предложено выделять в развитии этой генеративной структуры премейотический, мейотический и постмейотический периоды. R. Goldberg *et al.* [33] выделили две фазы развития пыльника: первая – закладка тычиночного бугорка и дифференциация тканей, вторая – деградация ряда тканей и вскрывание пыльника; в этой же работе авторы привели результаты исследования нескольких генов, специфичных для разных тканей стенки гнезда пыльника. На примере злаков с различным типом соцветия (колос – пшеница и метелка – двуколосник) Н.Н. Круглова [18-19] предложила периодизацию развития пыльника как сложной интегрированной системы, удобную в биотехнологических исследованиях злаков.

Цель данной работы заключалась в разработке периодизации морфогенеза пыльника растений-

интродуцентов рода остролодочник *Oxytropis* DC. на основании анализа детальных цитогистологических данных по формированию, дифференциации и специализации как клеток тканей стенки гнезда, так и клеток спорогенной ткани и их производных. Кроме того, цито-гистологические данные соотнесены с морфологическим критерием – соотношением чашечки и венчика.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили интродуцированные растения видов рода остролодочник *Oxytropis* (семейство Fabaceae Lindl.), включенных в «Красную книгу Республики Башкортостан» [12-13]: о. сходный *O. ambigua* (Pall.) DC. – реликтовый вид Южного Урала, о. Гмелина *O. gmelinii* Fisch. ex Boriss – редкий вид республики Башкортостан и о. уральский *O. uralensis* (Lam.) DC. – эндемик Южного Урала.

Применяли общепринятые методы фенологических [7] и цито-гистологических [2, 25] исследований. Пыльники на разных стадиях развития фиксировали в реактиве FAA. Постоянные препараты окрашивали сафранином по Картису с подкраской алциановым синим [2]. Препараты просматривали при различном увеличении объектива и фотографировали с применением светового микроскопа Axio Imager 1 (Carl Zeiss, Jena), а также при помощи цифрового микроскопа проходящего света Микровизор mVizo-103 (ООО «ЛОМО ФОТОНИКА», Санкт-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ цито-гистологических данных по морфогенезу пыльника свидетельствует о принципиальном сходстве этого процесса у всех трех изученных видов остролодочника. Ранее нами опубликованы эти данные по о. сходному [11-13], о. уральскому [24], о. Гмелина [15].

Приведем детальные данные по морфогенезу пыльника на примере о. сходного.

Согласно фенологическим наблюдениям 2008-2010 гг., развитие пыльника у о. сходного в условиях интродукционного питомника происходит в фенофазу бутонизации, когда длина бутона составляет от 1.5 до 3.0 мм, а длина всего соцветия – от 1.0 до 3.0 см. Зрелые пыльники отмечены в фенофазу начала цветения.

Начало морфогенеза пыльника связано с заложением тычиночного бугорка в примордии цветка. С увеличением размера тычиночного бугорка в нем путем множественных митотических делений происходит постепенное образование четырех лопастей пыльника одновременно с формированием специализированной ткани – связника, в котором формируется сосудисто-проводящий пучок. Далее каждая лопасть постепенно преобразуется в гнездо пыльника. В субэпидермальном слое меристемы каждого развивающегося гнезда пыльника дифференцируются клетки археспория, выделяющиеся

среди остальных клеток своими размерами и формой. В ходе дальнейшего развития каждая клетка археспория делится, отделяя в сторону будущего экзотеция клетку париетального слоя, а к центру гнезда пыльника – спорогенную клетку. Спорогенные клетки располагаются в 1-2 слоя. Полностью сформированные спорогенные клетки характеризуются клиновидной формой и наличием крупных ядер. Спорогенные клетки составляют спорогенную ткань. В процессе развития спорогенные клетки постепенно преобразуются в микроспороциты (материнские клетки микроспор). Микроспороцит приобретает типичную форму: вытянутая по длинной оси крупная клетка с крупным ядром. Спорогенный комплекс состоит из 6–10 микроспороцитов. В ходе развития пыльника постепенно формируется стенка гнезда. Первоначально все слои стенки состоят из достаточно однородных вытянутых клеток. Постепенно происходит формирование специализированных слоев стенки гнезда: экзотеций (эпидермис), эндотеций, средний слой и тапетум. Пыльник, стенка гнезда которого представлена всеми сформированными слоями, называют сформированным [6]. Таким образом, сформированный пыльник о. сходного приходится на стадию микроспороцитов. Сформированный пыльник имеет четыре гнезда, которые соединены между собой связником.

Мейоз микроспороцитов проходит обычным образом. По окончании I-го деления мейоза образуются два гаплоидных ядра, между которыми закладывается клеточная перегородка; таким образом формируется диада микроспор. Клетки диады микроспор претерпевают II-е мейотическое деление, в результате которого формируется тетрада гаплоидных микроспор. Расположение микроспор в тетрадах – тетраэдрическое. В процессе активного роста микроспоры обособляются друг от друга и значительно увеличиваются в размерах. Формируется пора прорастания. Ядра микроспор лежат в центре клеток. Дальнейшее развитие микроспор связано с их митотическими делениями, дающими начало двуклеточному пыльцевому зерну, представленному вегетативной клеткой и расположенной в её протопласте генеративной клеткой.

Двуклеточные пыльцевые зерна располагаются в зрелых (готовых к вскрыванию) пыльниках о. сходного. Таким образом, зрелые пыльцевые зерна у о. сходного – двуклеточные. Стенка гнезда зрелого пыльника представлена мощным эндотецием с фиброзными утолщениями, играющими основную роль при вскрывании пыльника, и хорошо развитым экзотецием – защитной тканью. Остальные ткани стенки гнезда пыльника постепенно дегенерировали.

В целом, данные по развитию пыльцевого зерна у растений рода остролодочник соответствуют аналогичным данным по другим бобовым [9, 11].

Провели анализ соответствия цито-гистологического статуса пыльника морфологиче-

ским характеристикам развивающегося цветка растений. В качестве морфологического критерия было выбрано удобное для наблюдений соотношение длины чашечки и венчика, предложенное Т.П. Белковской [8]. Полученные цито-гистологические и морфологические данные позволяют предложить периодизацию морфогенеза пыльника как сложной интегрированной системы у растений рода остролодочник:

этап формирования пыльника (формирование клеток археспория, формирование спорогенной ткани, начало формирования тканей стенки гнезда); морфологический критерий: венчик полностью скрыт в чашечке;

этап сформированного пыльника (стадия микроспороцита с фазой формирования и развития микроспороцита, фазой мейоза микроспороцита; стенка гнезда пыльника характеризуется наличием еще не специализированных, но уже сформированных тканей: экзотеций, эндотеций, средний слой, тапетум); морфологический критерий: венчик на треть выступает над чашечкой;

этап созревания пыльника (стадия микроспоры с фазой формирования диад и тетрад микроспор, фазой развития микроспоры, фазой митоза микроспоры; специализация тканей стенки гнезда; дегенерация клеток тапетума и среднего слоя; формирование фиброзных утолщений в оболочках клеток эндотеция); морфологический критерий: венчик выше чашечки на полную длину чашечки;

этап зрелого пыльника (стадия пыльцевого зерна с фазой формирования и развития пыльцевого зерна, фазой зрелого двуклеточного пыльцевого зерна, из тканей стенки гнезда ясно выражены узкоспециализированные экзотеций и эндотеций); морфологический критерий: венчик по длине значительно превосходит чашечку.

Успех интродукции растений оценивается по комплексу признаков. В последние годы разрабатывается эмбриологический анализ интродуцированных растений [20], в частности, анализ морфогенеза пыльника.

Предложенная нами периодизация морфогенеза пыльника с соответствующими морфологическими критериями (соотношение длины чашечки и венчика) может быть использована при проведении экспериментальных исследований интродуцированных растений рода остролодочник с целью повышения количества их жизнеспособных зрелых пыльцевых зерен, а значит, увеличения количества полноценных семян. Такого рода исследования успешно проведены, например, на яровой пшенице [3] по внекорневой обработке раствором борной кислоты растений, содержащих пыльники в фазе развития микроспоры.

В свою очередь, увеличение количества полноценных семян чрезвычайно важно для проведения работ по реинтродукции растений рода остролодочник в природные популяции.

Исследование поддержано программой «Ведущие научные школы Российской Федерации» (грант № НШ 7637.2010.4, лидер Школы – чл.-корр. РАН Т.Б. Батыгина, БИН РАН, Санкт-Петербург).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамова Л.М., Маслова Н.В., Каримова О.А.* Интродукция редких видов как способ сохранения биоразнообразия (на примере Республики Башкортостан) / Л.М. Абрамова, Н.В. Маслова, О.А. Каримова // Бюл. ГБС. 2004. Вып. 188. С. 110-118.
2. *Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др.* Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд. МГУ, 2004. 312 с.
3. *Батыгина Т.Б.* Эмбриология пшеницы. Л.: Колос, 1974. 206 с.
4. *Батыгина Т.Б.* Хлебное зерно. Л.: Наука, 1987. 103 с.
5. *Батыгина Т.Б., Терехин Э.С., Алимова Г.К., Яковлев М.С.* Генезис мужских спорангиев Gramineae и Ericaceae // Ботан. журн. 1963. Т. 48. № 8. С. 1108-1120.
6. *Батыгина Т.Б.* Пыльник как модель изучения морфогенетических потенций и путей морфогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 1. СПб.: Мир и семья, 1994. С. 120-121.
7. *Бейдеман И.Н.* Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Наука, 1974. 155 с.
8. *Белковская Т.П.* К антропоэкологии некоторых реликтовых и эндемичных видов астрагалов Кунгурской лесостепи // Экология опыления растений: Межвуз. сборник научн. трудов. Пермь: Изд. ПГУ, 1984. С. 34-49.
9. *Верещагина В.А., Колясников Н.Л., Новоселова Л.В.* Репродуктивная биология видов рода *Medicago*. Пермь: Изд. ПГУ, 2004. 226 с.
10. *Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н.* Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Оптимальная фаза микроспорогенеза // Известия РАН. Серия биол. 1997. № 6. С. 668-676.
11. *Колясников Н.Л.* Репродуктивная биология культивируемых и дикорастущих бобовых трав. Пермь: Изд. ПГСХА, 2006. 99 с.
12. Красная книга Республики Башкортостан. Т. 1. Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений. Уфа: Китап, 2001. 234 с.
13. Красная книга Республики Башкортостан (объединенный том) / под ред. А.А. Фаухудинова. Уфа: Полипак, 2007. 528 с.
14. *Круглова А.Е., Маслова Н.В.* Развитие пыльцевых зерен остролодочника сходного *Oxytropis ambigua* (Pall.) DC. в условиях интродукционного питомника ботанического сада и в природных условиях // Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия: Материалы междунар. научн. конф. Вологда, 2005. С. 93-95.
15. *Круглова А.Е.* Развитие пыльцы остролодочника Гмелина *Oxytropis gmelinii* Fish. ex Boriss в условиях интродукции питомника // Актуальные проблемы биологии и экологии: Материалы XII молодежн. научн. конф. Сыктывкар, 2005. С. 122.
16. *Круглова А.Е., Маслова Н.В.* Эмбриологический анализ остролодочника сходного *Oxytropis ambigua* (Pall.) DC. в условиях интродукции: развитие пыльника // Особь и популяция – стратегии жизни: Материалы IX Всеросс. популяц. семинара. Ч. 1. Уфа, 2006. С. 132-135.
17. *Круглова А.Е.* Эмбриология редкого вида Южного Урала остролодочника сходного: морфогенез пыльника // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2009. № 6 (100). С. 172-173.

18. *Круглова Н.Н.* Визуальная оценка стадий развития гаметофитов покрытосеменных растений // I Всеросс. конф. по ботан. ресурсоведению: Труды. СПб., 1996. С. 185-186.
19. *Круглова Н.Н.* К репродуктивной биологии злаков: качество пыльцевых зерен // Особь и популяция: стратегии жизни: Материалы IX Всеросс. популяц. семинара. Уфа, 2006. С. 135-139.
20. *Круглова Н.Н.* Эмбриологический подход к проблеме сохранения редких и исчезающих бобовых Южного Урала // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2009. № 6 (100). С. 174-175.
21. *Левина Р.Е.* Репродуктивная биология семенных растений. Обзор проблемы. М.: Наука, 1981. 96 с.
22. *Маслова Н.В., Кучеров Е.В.* Результаты изучения биологии при интродукции редких видов декоративных растений из рода *Oxytropis* DC. в Республике Башкортостан // Ботанические сады России: история, место и роль в развитии современного общества. Соликамск, 2001. С. 86-89.
23. *Маслова Н.В., Круглова Н.Н.* Развитие остролодочника *Oxytropis ambigua* (Pall.) DC в условиях питомника ботанического сада // Відновлення порушених природних екосистем. Донецк, 2002. С. 265-266.
24. *Маслова Н.В., Круглова Н.Н., Круглова А.Е.* Семенная продуктивность *Oxytropis uralensis* (L.) DC. в местах естественного произрастания // VIII Всероссийский популяц. семинар: Материалы. Нижний Новгород, 2005. С. 231-232.
25. *Маслова Н.В., Елизарьева О.А., Куватова Д.Н. и др.* Интродукционное изучение редких видов рода *Oxytropis* DC. в Ботаническом саду УНЦ РАН // Изучение заповедной флоры Южного Урала. Вып. 2. Уфа, 2006. С. 166-176.
26. *Мулдашев А.А., Галева А.Х., Маслова Н.В.* К охране остролодочников (*Oxytropis*, Fabaceae) на Южном Урале // Проблемы сохранения биоразнообразия на Южном Урале: Материалы регион. научно-практ. конф. Уфа, 2004. С. 71-74.
27. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1988. 170 с.
28. *Резникова С.А.* Цитология и физиология развивающегося пыльника. М.: Наука, 1984. 270 с.
29. *Bedinger P.A.* The remarkable biology of pollen // Plant Cell. 1992. V. 4. № 8. P. 879-887.
30. *Bedinger P.A., Edgerton M.D.* Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins // Plant Physiol. 1990. V. 92. № 1. P. 474-479.
31. *Chang M.T., Neuffer M.G.* Maize microsporogenesis // Genome. 1989. V. 32. № 2. P. 232-244.
32. *Eisner W.R., Sprague A.P.* Pollen counting on the microcomputer // Pollen et Spores. 1987. V. 29. № 4. P. 461-470.
33. *Goldberg R.B., Beals Th.P., Sanders P.M.* Anther development: basic principles and practical application // Plant Cell. 1993. V. 5. № 10. P. 1217-1229.
34. *Hamilton D.A., Mascarenhas J.P.* Gene expression during pollen development // Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge: Cambridge Univ. press, 1997. P. 40-58.
35. *Knox R.B.* The pollen grain // Embryology in Angiosperms / ed. B.M. Johri. Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag, 1984. P. 197-221.
36. *Mascarenhas J.P.* The male gametophyte of flowering plants // Plant Cell. 1989. V. 1. № 1. P. 657-664.
37. *Mascarenhas J.P.* Gene activity during pollen development // Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Molec. Biol. 1990. V. 41. № 1. P. 317-338.
38. *McCormick Sh.* Male gametophyte development // Plant Cell. 1993. V. 5. № 10. P. 1265-1270.
39. *Moore I., Diefenthal Th., Zarsky V.* A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in Arabidopsis and is expressed predominantly in pollen grains and seedlings // Nat. Acad. Sci. USA. Plant Biology. 1997. V. 94. № 1. P. 762-767.
40. *Natrova Z.* Quantitative analysis of free amino acid and carbohydrates in spring barley anthers at different stages of maturity // Biol. Plant. 1968. V. 10. № 2. P. 118-126.
41. *Uefuji H., Takase H., Hiratsuka H.K., Hotta Y.* Analysis of LIM8 gene expressed during microsporogenesis // Plant and Cell Physiol. 1997. V. 38. Suppl. P. 138-140.
42. *Vithanage H.I., Knox K.B.* Periodicity of pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in the grasses *Lolium perenne* L. and *Phalaris tuberosa* L. // Ann. Bot. 1980. V. 45. № 2. P. 131-141.
43. *Vijayaraghavan M.R.* Histochemical and ultrastructural studies on microspore mother cells during meiotic prophase in *Sesbania speciosa* // Phytomorphology. 1991. V. 41. № 1. P. 105-119.
44. *Willemsse G., Wetering K., Schrauwen J.* Regulation of two pollen specific genes during pollen development and determination // Physiol. Plant. 1990. V. 79. № 2. P. 47-53.
45. *Witte H.J.* Preliminary research into possibilities of automated pollen counting // Pollen et Spores. 1988. V. 30. № 1. P. 111-124.
46. *Xu H.-L., Swoboda I., Bhalla P.L., Singh M.B.* Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants // Plant Biol. 1999. V. 96. № 3. P. 2554-2558.

PERIODIZATION OF ANTHER MORPHOGENESIS IN THE SPECIES OF *OXYTROPIS* DC. (FABACEAE)

© 2011 A.E. Kruglova

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

On the basis of the first received cyto-histological data on the development of anther of introduced plants *Oxytropis* DC. (Fabaceae) the periodization of morphogenesis of this generative structure as a complex integrated system has proposed. This periodization can be used in conducting of experimental investigations of introduced plants with a view to increase the number of full mature pollen grains.

Key words: rare plants, anther, morphogenesis, *Oxytropis* DC.