

РАЗВИТИЕ МИКРОСТРОБИЛА У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *TAXACEAE*

А.И. РУГУЗОВА

Изучение мужской репродуктивной сферы у видов семейства *Taxaceae* Lindl. было начато в конце XIX – начале – XX веков [10, 12, 17, 24]. Работы, посвященные развитию мужской генеративной сферы у видов семейства *Taxaceae*, время от времени обобщались в сводках по эмбриологии голосеменных [4, 22]. Однако большинство авторов изучали развитие мужского гаметофита у *Taxus baccata* L. Остальные виды *Taxaceae* в этом отношении изучены значительно меньше. Развитию микроспорангия у видов *Taxaceae* посвящены единичные работы [1, 19], также выполненные на *T.baccata*.

Цель настоящего исследования – установить закономерности развития микростробила и микроспорангия у некоторых видов семейства *Taxaceae* в условиях культуры в Крыму.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований являлись: *Taxus cuspidata* Zieb.et Zucc и *Torreya grandis* Fort., интродуцированные в Никитском ботаническом саду (НБС) и представленные в арборетуме однодомными особями. Фенологические наблюдения и сбор материала для эмбриологических исследований проводили каждые семь дней, а в период мейоза и перед опылением через сутки. Собранные образцы фиксировали по Карнуа (6:3:1), хранили в 70%-ном этаноле. Постоянные препараты готовили по общепринятой в цитоэмбриологии методике [6]. Толщина срезов 10-12 микрон. Препараты окрашивали метиловым зеленым – пиронином по Унна с подкраской алциановым синим [9]. Анализ препаратов проводили на микроскопе Jenaval, рисунки выполнены с помощью рисовального аппарата РА-4.

Результаты и обсуждение

У *T.cuspidate* и *T.grandis* микростробилы закладываются в июне в пазухах хвоинок на побегах прироста текущего года. В течение июля у обоих видов формируются микроспорофиллы. В августе в субэпидермальном слое микроспорофилла дифференцируются несколько археспориальных клеток, которые выделяются своими крупными размерами, плотной цитоплазмой и большим ядром с одним или несколькими ядрышками (рис.1 А, 2 А). На ультраструктурном уровне установлено, что в цитоплазме археспориальных клеток много свободных рибосом, а клеточные стенки пронизаны многочисленными плазмодесмами [2]. Археспориальные клетки делятся периклинально и дают начало двум рядам клеток (рис. 1 Б, 2 Б). Слой клеток, расположенных под эпидермисом, еще раз делится периклинально, формируя клетки средних слоев стенки микроспорангия (рис. 1 В, 2 В). Второй слой клеток, сформировавшихся после деления археспория, делится во всех направлениях и образует спорогенную ткань. Клетки средних слоев небольшие, прямоугольной формы, со светлой цитоплазмой и маленьким интенсивно окрашенным ядром с несколькими ядрышками (рис. 1 Г, 2 Г). В процессе развития микроспорангия эти клетки вытягиваются в радиальном направлении, в их цитоплазме появляются вакуоли, ядро принимает удлинено-овальную форму. У *T.cuspidate* клетки средних слоев очень скоро начинают дезинтегрировать и во время мейоза в материнских клетках микроспор полностью лизируют (рис. 1 Д-Ж). У *T.grandis* клетки средних слоев начинают дезинтегрировать на стадии мейоцитов, но лизируют только в период созревания

микроспор (рис. 2 Ж-Л). Исследователи, изучавшие формирование стенки микроспорангия у хвойных растений, чаще всего только упоминают о числе рядов клеток средних слоев, не описывая ни их структуру, ни продолжительность жизни. Хотя имеются сведения, что они играют важную роль в питании спорогенной ткани на ранних стадиях развития [2]. У покрытосеменных растений клетки средних слоев пыльника изучены достаточно хорошо и установлены их многогранные функции: запасаящая (депо крахмала и других питательных веществ), транспорта ассимилянтов, секреторная, механическая, связанная со вскрытием стенки пыльника. Очевидно, что все эти функции (кроме механической) выполняют клетки средних слоев и у голосеменных растений. У обоих изученных нами видов клетки средних слоев на ранних стадиях развития накапливают большое количество крахмала. Его гидролиз проходит постепенно, по мере развития спорогенной ткани.

К началу сентября стенка микроспорангия у обоих видов состоит из трех слоев клеток: эпидермиса, сформированного из антиклинально делящихся клеток поверхностного слоя микроспорофилла, и двух средних слоев, которые окружают активно делящиеся клетки спорогенной ткани. Спорогенные клетки несут крупное ядро с одним или несколькими ядрышками, окруженное плотной цитоплазмой (рис. 1 Г, 2 Г). В центре спорогенной ткани выделяются несколько групп клеток, которые интенсивно окрашены, их протопласт отходит от клеточной стенки, в ядрах заметны признаки дезинтеграции. Особенно много таких клеток было у *T. grandis*, тогда как у *T. cuspidate* их было значительно меньше. Во время дифференциации микроспороцитов эти клетки лизировали. Подобные клетки описаны также у *T. baccata* [19], исследователи полагают, что для этого вида дегенирирующие спорогенные клетки являются нормой развития и служат питательной средой для других спорогенных клеток. С этим можно согласиться, поскольку в это время тапетум еще не сформирован, но появление большого числа дегенирирующих спорогенных клеток у *T. grandis* также может быть вызвано неблагоприятными условиями окружающей среды. У этого вида развитие спорогенной ткани проходит в августе – январе, в период с частой сменой температуры воздуха. К началу сентября клетки самого наружного слоя спорогенной ткани становятся прямоугольными, их клеточные стенки утоньшаются, цитоплазма становится менее плотной, чем в спорогенных клетках (рис. 1 Д, 2 Д) – дифференцируется тапетум. В процессе дальнейшего развития клеток тапетума их цитоплазма уплотняется, ядро увеличивается и делится, кариокинез не сопровождается цитокинезом, и клетки становятся двуядерными (рис 1 Е-К, 2 Е-К). Клетки тапетума у обоих видов дезинтегрируют в период распада тетрад, а полностью лизируют во время формирования пыльцевых зерен. Сформированная стенка микроспорангия у обоих видов состоит из крупных клеток эпидермиса, двух средних слоев, клетки которых вытянуты в радиальном направлении, и одного слоя двуядерных клеток тапетума, которые окружают крупные, многоугольные клетки спорогенной ткани с густой цитоплазмой и большим ядром, занимающим большую часть клетки. К началу ноября у *T. cuspidate* клеточные стенки спорогенных клеток утолщаются, ядра увеличиваются, дифференцируются мейоциты. Электронно-микроскопическими исследованиями установлено, что в это время между плазмолемой и клеточной стенкой начинает формироваться каллозная оболочка, которая окружает микроспороциты, в цитоплазме накапливается большое количество рибосом, в ядре, рядом с ядерной мембраной появляются вакуоли [2,19]. Исследователи считают, что вакуоли в ядре появляются в результате оттягивания внутренней ядерной мембраны в процессе сокращения хромосом. Хромосомы связаны с ядерной мембраной своими концами, и их сжатие начинается от ядерной оболочки. У *T. baccata* вакуоли в ядре были наиболее крупными

на стадии пахитены, когда хромосомы были полностью конденсированы. Вакуоли в ядре исчезают к концу профазы, когда хромосомы теряют связь с ядерной мембраной и движутся к экватору [19].

Мейоз у *T.cuspidate* проходит в третьей декаде ноября – первой декаде декабря. Оптимальные температуры его прохождения от + 6° до + 9° С. У *T.grandis* материнские клетки микроспор дифференцируются к началу января, но мейотически делятся в конце марта – начале апреля. Оптимальная температура прохождения мейоза у этого вида колеблется от + 6° С до + 11° С. Нарушения в мейозе у изученных нами видов вызваны низкими температурами воздуха, что в дальнейшем обуславливает формирование нежизнеспособных микроспор и пыльцевых зерен. У изученных видов продолжительность мейоза в пределах дерева 7–10 дней. Для них характерна асинхронность прохождения мейоза не только в пределах стробила, но и в пределах микроспорангия (рис. 1 З-Ж, 2 З-И).

Благодаря асинхронности протекания мейоза жизнеспособная пыльца образуется при любых погодных условиях. Асинхронность прохождения мейоза характерна и для других хвойных растений [18]. Исследователи объясняют это явление отсутствием у голосеменных растений плазмодесм и цитоплазматических мостиков между микроспороцитами, которые характерны для покрытосеменных растений.

J. Neslop-Harrison [15] пишет, что обмен растворенными в цитоплазме веществами через плазмодесмы обеспечивает синхронность прохождения ранних стадий развития микроспороцитов у покрытосеменных растений.

Тетрады микроспор у *T.cuspidate* формируются по сукцессивному типу (рис. 1 Ж - И), у *T.grandis* – по симультанному (рис. 2 К). Согласно электронно-микроскопическим данным активное участие в формировании клеточных перегородок между ядрами тетрады микроспор принимает пузырьково-микротрубочный комплекс цитоплазмы [3, 2, 20]. Во время формирования перегородок происходит отложение каллозы вокруг микроспор. У обоих видов формируются тетраэдрические и изобилатеральные тетрады микроспор. Клетки тетрады с плотной цитоплазмой, ядро расположено в центре клетки, хроматин равномерно распределен по всему объему ядра в виде крупных глыбок, в цитоплазме видны мелкие крахмальные зерна. У *T.cuspidate* тетрады микроспор формируются в первой половине декабря, а у *T.grandis* – во второй декаде апреля. У *T.cuspidate* иногда вместо тетрады микроспор формируется диада (рис. 1 И). Очевидно, второе деление мейоза в этих клетках не прошло. Изредка встречали диады, несущие по два ядра, по-видимому, мейоз II не завершился цитокинезом. Такие диады, вероятно, формируют нежизнеспособные пыльцевые зерна которые быстро дегенерируют, поскольку в выборках зрелой пыльцы двуядерные пыльцевые зерна не встречаются. Распад тетрад и образование молодых микроспор у *T.cuspidate* проходит во второй половине декабря, а у *T.grandis* в конце апреля – начале мая. У обоих видов микроспоры сферической формы со светлой цитоплазмой, ядро с одним ядрышком расположено в центре клетки (рис. 2 Л). Гранулярно-ритикулярная структура кариоплазмы, характерная для клеток тетрады, в молодой микроспоре исчезает. Созревание микроспор у *T.cuspidate* длится два месяца (январь, февраль), у *T.grandis* этот процесс проходит в течение 20 – 25 суток (первая – вторая декады апреля). В этот период микроспоры значительно увеличиваются, клеточная оболочка утолщается, цитоплазма дифференцируется на две зоны: ядро окружает плотная цитоплазма с большим количеством крахмальных зерен, на периферии клетки цитоплазма светлая, мелко вакуолизована, с единичными крахмальными зёрнами.

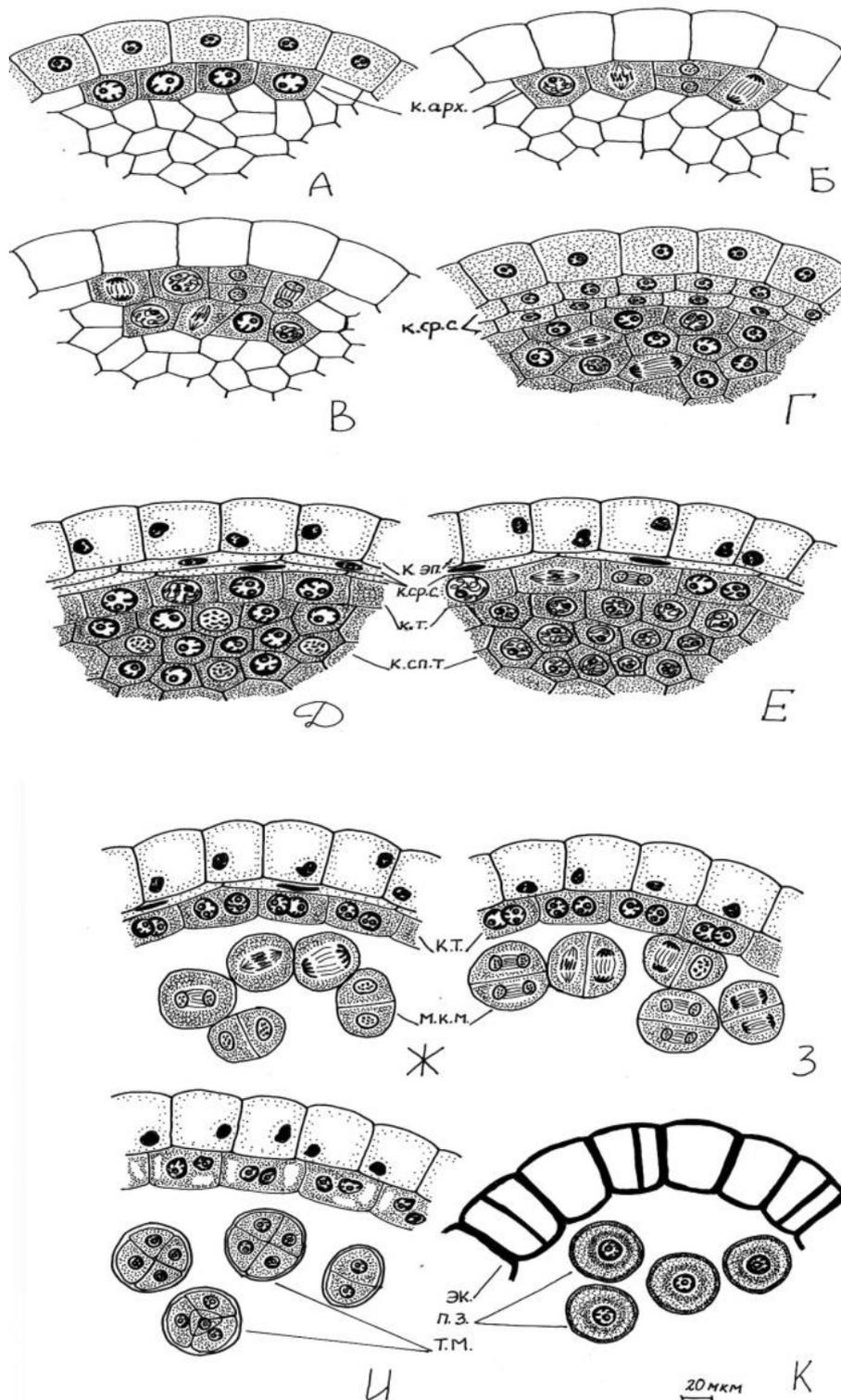


Рис. 1 (А-К) Последовательные стадии развития стенки микроспорангия и пыльцевых зерен у *Taxus cuspidate* (к. арх. – клетки архегония; кл. сп. т. – клетки спорогенной ткани; к. ср. с. – клетки средних слоев; к. эп. – клетки эпидермиса; м. к. м. – материнские клетки микроспор; м. м. – молодая микроспора; п. з. – пыльцевые зерна; т. м. тетрады микроспор; эк. – экзотеций).

В период созревания микроспор все слои стенки микроспорангия (кроме клеток эпидермиса) полностью лизируют. В клетках эпидермиса цитоплазма и ядра также лизируют, клеточные стенки заметно утолщаются, появляются фиброзные утолщения – образуются экзотеций (рис. 1К, 2 М). Образование экзотеция характерно для всех хвойных растений [22]. У *T. cuspidate* в течение марта в микроспорах проходит гидролиз крахмала, ядро увеличивается, цитоплазма несколько уплотняется. В начале апреля микроспорангии трескаются, и пыльцевые зерна высыпаются. Пыльцевые зерна сферической формы, без воздушных мешков, большое ядро интенсивно окрашено и находится в центре клетки (рис. 1 К).

У *T. grandis* ядро зрелой микроспоры делится с образованием двух ядер, которые очень похожи по форме, размеру и структуре кариоплазмы. Но, как только между ядрами формируется клеточная перегородка, ядро, расположенное ближе к дистальному полюсу мигрирует к центру клетки и значительно увеличивается. Другое ядро перемещается к проксимальному полюсу, оно окружено небольшим количеством цитоплазмы, ограниченной клеточной стенкой – формируется небольшая чечевицеобразная антерициальная клетка. Большую часть клетки занимает интенсивно окрашенное ядро с крупным ядрышком (рис. 2 М). Значительный объем пыльцевого зерна занимает клетка трубки с плотной цитоплазмой и большим ядром с ядрышком. Деление микроспоры с образованием антерициальной клетки и клетки трубки проходит у этого вида за неделю до опыления. Пыльцевые зерна сферической формы, без воздушных мешков, двуклеточные, оболочка состоит из экзины и интины, на дистальном полюсе видна небольшая редуцированная проростковая борозда, которая описана и у других видов рода *Torreya*.

Жизнеспособность пыльцевых зерен у *T. grandis* колеблется от 70% до 82%. Вылет пыльцевых зерен из микроспорангия наблюдается во второй половине мая.

Микростробилы у *T. cuspidate* почти сферической формы (1,8-2мм), расположены на короткой ножке. Каждый стробил несет 9 – 11 щитковидных микроспорофиллов с 5 – 9 микроспорангиями, которые расположены радиально.

У *T. grandis* микростробилы эллипсоидные, одиночные, их длина 5 – 7мм. Каждый микростробил несет 25–30 дорсивентральных, с зазубренным верхним краем, микроспорофиллов с 2–4 (чаще 3) свисающими микроспорангиями. Микроспорофиллы расположены на короткой ножке.

У видов семейства *Taxaceae* описаны как одноклеточные пыльцевые зерна [23], так и двуклеточные [20, 13, 11]. Для видов из родов *Taxus*, *Pseudotaxus*, *Austrotaxus* характерны одноклеточные пыльцевые зерна без воздушных мешков. У видов из родов *Amentotaxus* и *Torreya* пыльцевые зерна - двуклеточные. У видов *Austrotaxus* и *Amentotaxus*, как и у *Cephalotaxus*, формируются собрания микростробилов, тогда как для остальных родов этого семейства характерны одиночные микростробилы. У представителей *Taxaceae* микроспорофиллы характеризуются чрезвычайным разнообразием – у *Pseudotaxus* и *Austrotaxus* микроспорофилл состоит из одной ножки, на верхушке которой расположены 2 – 6 микроспорангия; у *Taxus* микроспорофиллы щитковидные, на короткой ножке, с 9 –11 радиально расположенными микроспорангиями; у *Amentotaxus* и *Torreya* на короткой ножке расположены дорсивентральные микроспорофиллы с 2–5 свисающими микроспорангиями. А.Л.Тахтаджян [8] считает, что исходной была радиально-симметричная форма микроспорофилла (как у *Austrotaxus*), от него произошли щитковидные микроспорофиллы (как у *Taxus*) в результате расширения и уплощения его верхушечной части.

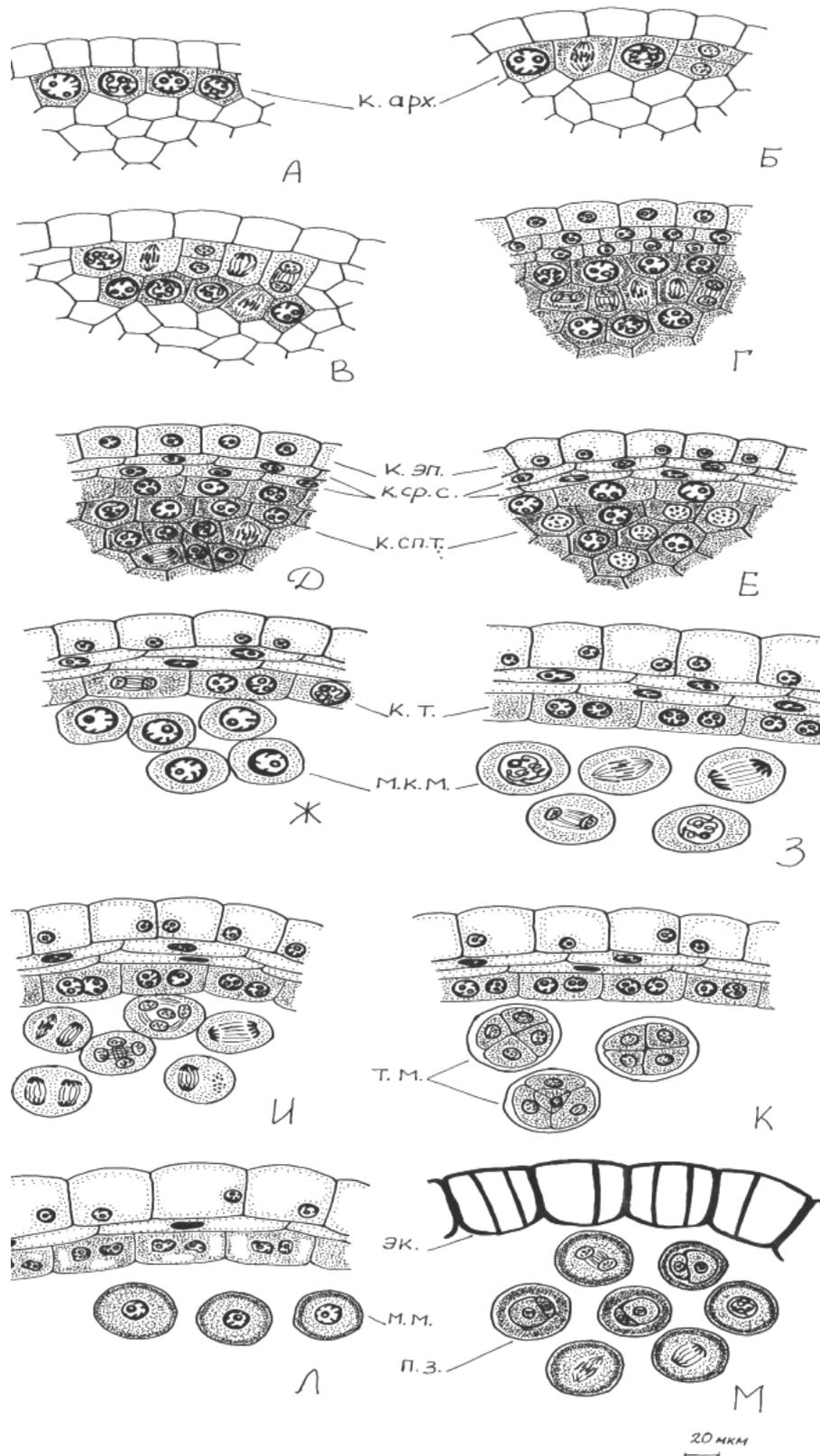


Рис. 2 (А-М). Последовательные стадии развития стенки микроспорангия и пыльцевых зерен у *Torreya grandis* (к. арх. – клетки архегония; кл. сп. т. – клетки спорогенной ткани; к. ср. с. – клетки средних слоев; к. эп. – клетки эпидермиса; м. к. м. – материнские клетки микроспор; м. м. – молодая микроспора; п. з. – пыльцевые зерна; т. м. – тетрады микроспор; эк. – экзотеций).

Дорсивентральный тип микроспорофилла (как у *Torreya*) образовался из щитковидного путем редукции адаксиальных микроспорангиев. Таким образом, у представителей *Taxaceae* можно проследить развитие микроспорофилла от радиально-симметричного через щитковидный до дорсивентрального.

Выводы

1. Мужские репродуктивные органы у обоих видов формируются в пазухах хвоинок на приросте текущего года. Микростробилы одиночные, состоящие из 9–11 микроспорофиллов с 5–9 спорангиями у *T.cuspidate* и из 25–30 микроспорофиллов с 2–4 спорангиями у *T.grandis*.
2. От закладки микростробилов до их созревания у *T.cuspidate* проходит 9 месяцев, а у *T.grandis* – 11 месяцев. Последовательно образуются: микроспорофиллы, четырехслойная стенка микроспорангия, спорогенная ткань, микроспороциты, микроспоры, пыльцевые зерна.
3. Для видов характерна асинхронность прохождения мейоза даже в пределах микроспорангия, что обеспечивает формирование жизнеспособной пыльцы при любых погодных условиях. Нарушения в мейозе обусловлены низкой температурой воздуха.
4. Сформированная стенка микроспорангия состоит из эпидермиса, двух средних слоев, одного слоя двухядерных клеток тапетума. В зрелом спорангии она представлена только экзотецием.
5. Тетрады микроспор у *T.cuspidate* формируются по сукцессивному типу, у *T.grandis* – по симультанному.
6. У обоих видов пыльцевые зерна сферической формы, без воздушных мешков, одноклеточные у *T.cuspidate* и двуклеточные, с редуцированной проростковой бороздой у *T.grandis*. Жизнеспособность пыльцы у первого вида варьирует от 31 до 72%, у второго – от 70 до 82% в зависимости от погодных условий в период мейоза.

Список литературы

1. Георгиев Г.Н. Морфогенетическое и цитозембриологическое исследование *Taxus baccata* L. I. Развитие мужских генеративных органов // Годишник на Софийския университет «Климент Орхидский». – 1985. – Т.75. – Кн.2. – С.21-30.
2. Козубов Г.М., Тренин В.В., Тихова М.А., Кондратьева В.П. Репродуктивные структуры голосеменных растений. - Л.: Наука, 1982. – 104 с.
3. Кордюм Е.Л. Эволюционная цитозембриология покрытосеменных растений – Киев: Наукова думка, 1982. – 219 с.
4. Мошкович А.М. Эмбриология хвойных. – Кишинев: Штиинца, 1992. – 250 с.
5. Никифоров Ю.Л., Ругузов И.А. Морфогенез генеративных органов и опыление у тиса ягодного // Половая репродукция хвойных. Новосибирск: Наука, 1973. – Т.1. – С.135-138.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
7. Ругузов И.А., Склонная Л.У. Формирование мужского гаметофита у некоторых представителей сосновых, кипарисовых и тисовых // Труды Никит. ботан. сада. – 1992. – Т.113. – С.62-73.
8. Тахтаджян А.Л. Высшие растения. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1956. – Т.1. – 488 с.
9. Шевченко С.В., Чеботарь А.А. Особенности эмбриологии маслины европейской (*Olea europaea*) // Труды Никит. ботан. сада. – 1992. – Т.113. – С. 52-61.
10. Belaieff W.C. Zur Lehre von dem Pollenschlauche der Gymnospermen II // Ber. Deutschen bot. Ge. – 1891. – V. 9. – P. 280-286.

11. Chen Zu-Keng, Wang Fu-Xiong. Систематическое положение рода *Amentotaxus* на основании изучения его эмбриологии // Чжоу фэньяэй сюэбао Acta phytotokou sin. – 1984. – V. 22. № 4. – P.206-213.
12. Coker W.C. On the spores of certain Coniferae // Bot. Gaz. – 1904. – V. 38. – P. 206-213.
13. Coulter J.M., Land W.J.G. Gametophyte and embryo of *Torreya taxifolia* // Bot. Gaz. – 1905. – V. 39. – P. 161-178.
14. Dupler A.W. The gametophytes of *Taxus canadensis* Marsh. // Bot. Gaz. – 1917. – V.64. № 2. – P. 115-136
15. Heslop-Harrison J. Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants // Endeavour – 1966 – V. 25, № 95. – P. 65-72.
16. Hofmeister W. Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Frucktbildung hoherer Kryptogamen und der Samenbildung der Coniferen – Fr. Hofmeister, Leipzig – 1851. – P. 179/
17. Jager L. Beitrage zur Kenntnis des Eudospermibildung und zur Embryologie von *Taxus baccata* L. // Flora. – 1899. – Bd. 86. – S. 241-288.
18. Moitra A., Bhatnager S.P. Ultrastructura, cytochemical and histochemical studies on pollen and male gamete development in Gymnosperms // Gamete Res. – 1982. – V. 5, № 1. – P.71-112.
19. Pennell R.I., Bell P.R. Microsporogenesis in *Taxus baccata* L.: the development of the archaesporium // Ann. Bot. – 1985. – V. 56, № 3. – P. 415-427.
20. Robertson A. Studies in the morphology of *Torreya californica*. I Spore formation // New Phytologist. – 1904. – V. 3, № 6-7. – P. 133-148.
21. Saxton W.T. Notes on conifers. VIII. The morphology of *Austrotaxus spicata* Compton // Ann. Bot. – 1934. – V. 48. – P. 411-427.
22. Singh H. Embryology of gymnosperms. – Berlin – Stuttgart, 1978. – 304 p.
23. Sterling C. Structure of the male gametophyte in gymnosperms // Biol. Rev. – 1963. – V. 38. – P. 167-203.
24. Strasburger E. Uber das Verhalten des Pollens und die Befruchtungsvorgange bei den Gymnospermen // Histol. Beitr. – 1892. – Hf 4. – P. 1-158.

Microstrobile development in some species of family Taxaceae

Ruguzova A.I.

Microstrobile development in two species of family Taxaceae - *Taxus cuspidata* Zieb.et Zucc and *Torreya grandis* Fort. in the conditions of reproduction to the south coast of Crimea is described in this article. As the result of investigations it was found out that in both species single microstrobile forms in the axil of an acerose leaf on the present year shoots. It takes 9 months in *T.cuspidata* and 11 months in *T.grandis* from the microstrobiles walling till their maturity. Both species are characterized with asynchronic passing of meiosis even in the borders of microsporangium. Thanks that some viable pollen grains form in any weather conditions. Pollen viability in *T.cuspidata* is from 31 to 72 % and in *T.grandis* it is from 70 to 82 %. It depends from weather conditions during the period of meiosis.