

ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ СЕМЯН *PINUS SIBIRICA* DU TOUR В УСЛОВИЯХ КИЕВА

*Рассмотрены особенности репродуктивного цикла и семенная продуктивность сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) в условиях интродукции. Приведены некоторые морфометрические параметры репродуктивных структур и календарные сроки прохождения процессов во время формирования семян.*

Ключевые слова: *Pinus sibirica*, пыльцевые зерна, женские шишки, семязачатки, опыление, оплодотворение, семена.

Интродукция растений в настоящее время является одним из ведущих направлений ботанических исследований. Однако, если на ранних этапах ее основной задачей было привлечение новых видов растений, то сегодня все больше внимания уделяется созданию устойчивых растительных сообществ — интродукционных популяций [7]. Для создания таких популяций необходимы растения, полученные из семян, сформировавшихся в новых условиях культуры. Исследования многих видов голосеменных и покрытосеменных растений показали, что течение эмбриологических процессов обусловлено не только генетическими особенностями организма, но и в значительной степени факторами внешней среды [19, 24]. Изучение полового процесса растений в условиях интродукции позволяет решить практическую задачу — получение полноценных жизнеспособных семян и расширяет наши знания об адаптивных возможностях видов.

Цель работы — изучение особенностей репродуктивного цикла *Pinus sibirica* Du Tour в условиях Киева.

Растения *Pinus sibirica* — однодомные деревья до 35 м высотой, диаметр ствола — до 1,8 м. Вид естественно произрастает на территории Российской Федерации — в Западной Сибири от 48° до 66° с. ш., в Восточной Сибири и на

Урале. На запад от Урала распространяется до Тиманского кряжа. В Центральном Алтае верхняя граница распространения — на высоте 1900—2000 м н. у. м., а в южных районах — до высоты 2400 м н. у. м. Сосна сибирская растет также на территории Казахстана, Монголии и Северного Китая [18]. Способна расти на многолетних мерзлых почвах, требовательна к относительной влажности воздуха. Оптимальные условия для роста — пологие склоны и участки, на которых выпадает 700 — 1000 мм осадков в год, средняя температура вегетационного периода — 12,5—13,0 °С [6]. В разных местах произрастания абсолютный минимум достигает –40... 52 °С, годовое количество осадков — 300–600 мм, безморозный период длится 120–140 дней [1].

Среднегодовая температура района интродукции — +8,0 °С. Самый холодный месяц — январь со среднемесячной температурой –3,5 °С. Абсолютный минимум температуры воздуха — –32,9 °С. Средняя температура июля — +19,8 °С, абсолютный максимум — +39,4 °С. Длительность безморозного периода — 144–215 дней. Среднегодовое количество осадков — около 641 мм, большая часть их выпадает в период с апреля по октябрь [4].

Материалы и методы

В Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины *P. sibirica*

растет в Кониферетуме и на территории ботанико-географического участка «Алтай». В Кониферетуме произрастают 13 деревьев неизвестного происхождения. Средний диаметр ствола — $(19,8 \pm 1,7)$ см. В 2012–2013 гг. на 7 деревьях образовывались микростробилы, на 5–10 — шишки. Количество шишек, образовавшихся на одном дереве, — от 22 до 108 шт.

На участке «Алтай» растут 37 деревьев, выращенных из семян, полученных в 1953–1956 гг. из Красноярского края [12]. Средний диаметр ствола в насаждении — $(17,7 \pm 0,9)$ см. В 2013 г. микростробилы образовали 6 деревьев, женские шишки — 3. Количество шишек на одном дереве — от 2 до 100 шт.

Фенологические наблюдения проводили с интервалом 7 суток по методике Г.Д. Ярославцева с соавт. [15].

Для эмбриологических исследований материал фиксировали по Карнуа и хранили в 70 % этаноле. Постоянные препараты готовили по общепринятой в цитозембриологии методике [11]. Процесс оплодотворения наблюдали на просветленных семязачатках, для этого использовали методику, разработанную для цветковых растений [7] с собственными модификациями для хвойных. Пыльцевые зерна изучали на временных препаратах, окрашенных ацетокармином [11]. Анализ препаратов проводили с помощью светового микроскопа Janaval (Karl Zeiss). Микрофотографии сделаны с использованием микроскопа AxioScope A 1 и камеры AxioCam ERc 5s (Karl Zeiss).

Результаты

В условиях интродукции у *P. sibirica* закладывается большое количество микростробилов и достаточное количество женских шишек. К моменту опыления мужские и женские генеративные структуры полностью сформированы. Зрелые пыльцевые зерна имеют два воздушных мешка и содержат остатки двух проталиальных клеток, ядра генеративной клетки и клетки-трубки. Размеры пыльцевых зерен варьируют даже в пределах одного микростробила. Так, средняя длина пыльцевого зерна с воздушными мешками — $(71,6 \pm 0,6)$ мкм (минималь-

ная — 61,1 мкм, максимальная — 79,5 мкм), высота пыльцевого зерна — $(37,8 \pm 0,7)$ мкм (минимальная — 37,8 мкм, максимальная — 43,0 мкм), длина воздушного мешка — $(27,6 \pm 0,3)$ мкм (минимальная — 21,4 мкм, максимальная — 31,9 мкм). Процент морфологически нормальных пыльцевых зерен довольно высокий (93,7 %), однако отмечены аномально мелкие пыльцевые зерна (длина с воздушными мешками — $(50,9 \pm 2,8)$ мкм, высота — $(40,0 \pm 1,8)$ мкм) и пыльцевые зерна с одним воздушным мешком (рис. 1). Содержимое аномально мелких пыльцевых зерен интенсивно окрашивается ацетокармином, ядра при этом не просматриваются, вероятно, в них не произошли митотические деления при формировании мужского гаметофита и к моменту поллинии содержимое дегенерирует.

У *P. sibirica* в условиях Киева поллинияция начинается в I–II декаде мая. Продолжительность этого процесса зависит от погодных условий (температура и влажность воздуха).

К моменту вылета пыльцевых зерен женские генеративные структуры *P. sibirica* представлены макростробилами, состоящими из центральной оси, на которой расположены хорошо развитые кроющие и семенные чешуи. На абаксиальной поверхности в базальной части семенных чешуй центральной части шишки расположены два семязачатка,

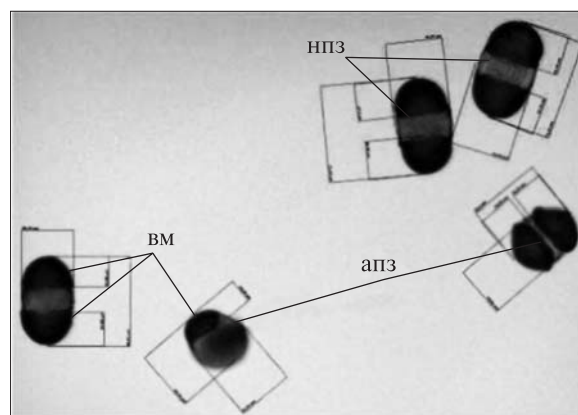


Рис. 1. Пыльцевые зерна во время поллинииции: апз — аномальные пыльцевые зерна; вм — воздушные мешки; нпз — нормальные пыльцевые зерна

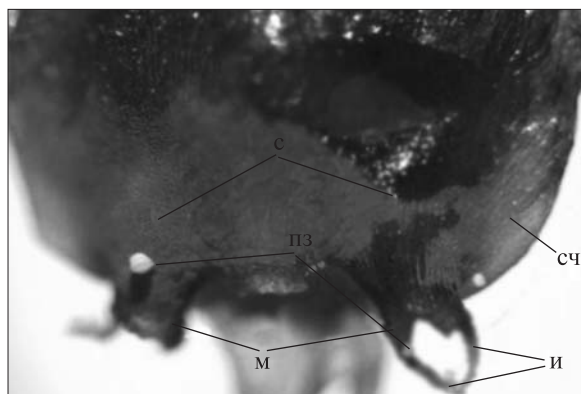


Рис. 2. Семенная чешуя *Pinus sibirica* с двумя семязачатками в период опыления: и — интегумент; м — микропиле; пз — пыльцевые зерна; с — семязачатки; сч — семенная чешуя

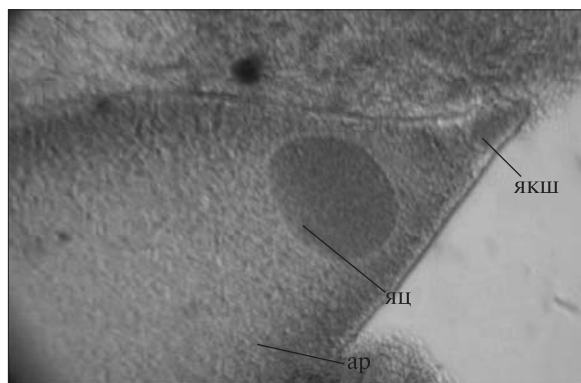


Рис. 3. Архегоний в опыленном семязачатке, через год после опыления (II декада мая): ар — архегоний; яц — ядро центральной клетки; якш — ядро клетки шейки

состоящие из хорошо развитого нуцеллуса и интегумента, который, возвышаясь над нуцеллусом, формирует микропиларный канал, а затем разделяется на две длинные лопасти (рис. 2).

На семенных чешуях в апикальной и базальной частях шишки семязачатки не формируются. Количество фертильных чешуй в шишках — от 12 до 24. В период опыления мы не отмечали дегенерировавших или недоразвитых семязачатков, на каждой фертильной семенной чешуе было по два семязачатка. Таким образом, потенциальная семенная про-

дуктивность составляет 24–48 семян на шишку. Среднее количество фертильных чешуй в шишке — $19,6 \pm 2,4$, потенциальная семенная продуктивность — 39,2 семени на шишку.

Оплодотворение у *P. sibirica* происходит в следующем вегетационном сезоне. В период между опылением и оплодотворением (12 мес) происходит рост пыльцевых трубок, завершается развитие мужского и женского гаметофитов, а весной после повышения температуры воздуха происходит активный рост всех частей женских шишек. Развиваются только опыленные семязачатки (рис. 3), неопыленные — дегенерируют. В условиях Киева оплодотворение может происходить в период с III декады апреля до II декады мая. В это время в семязачатках видны 3–4 хорошо сформированных архегония, окруженные одним рядом клеток обкладки. Крупное ядро яйцеклетки расположено в центральной части архегония. К каждому архегонию подходит одна пыльцевая трубка. Она проходит между шейковыми клетками непосредственно к архегонию и изливает содержимое в яйцеклетку. После этого один из спермиев направляется к ядру яйцеклетки и сливается с ним (рис. 4).

Вероятно, возобновление роста пыльцевых трубок после периода покоя и скорость этого процесса зависят от максимальной температуры воздуха. В семязачатках, собранных с деревьев, произрастающих в тени (участок «Алтай»), в 2013 г. оплодотворение отмечено во II декаде мая, а в семязачатках с деревьев, произрастающих на солнечном склоне, в эти же сроки наблюдали многочисленные зародыши. Оплодотворение было отмечено в 1–2 (редко — в 3) архегониях одного семязачатка. В некоторых семязачатках оплодотворение не наблюдали ни в одном архегонии, несмотря на то, что они были полностью сформированы. После оплодотворения развитие зародышей проходит стремительно. В семязачатках с деревьев, в которых оплодотворение произошло во II декаде мая, через 4 недели (во II декаде июня) отмечали стадию глобулярных зародышей. На этом этапе семена имеют разные размеры и внешне различаются:

— часть семян (2,6 %) повреждена насекомыми, в оболочке видно отверстие, содержимое отсутствует. Некоторые шишки полностью (с чешуями) съедены насекомыми;

— семена с плотной оболочкой, эндосперм занимает весь объем семени. На эмбриологических препаратах видно, что в таких семенах остался один развивающийся зародыш, а клетки центральной части женского гаметофита дегенерируют, формируя коррозионную полость (рис. 5). Формирование этой полости начинается после выхода проэмбрио из полости архегония в ткань женского гаметофита. Таких семян было 5,2 %;

— семена с плотной, одревесневшей оболочкой, нормального размера, но внутреннее содержимое занимает 1/2 или меньше объема семени. Это семена, в которых прошло оплодотворение, однако вскоре после этого развитие приостановилось на разных стадиях (рис. 6). Таких семян было больше всего — 47,3 %;

— семена нормального размера с одревесневшей оболочкой и содержимым, занимающим почти весь объем семени, на продольном разрезе через центр семени коррозионная полость не видна. На эмбриологических препаратах видно, что в этих семенах на данном этапе развиваются множественные глобулярные зародыши в ткани женского гаметофита, причем среди них уже выделились несколько более крупных (рис. 7). Доля таких семян — 8,7 %;

— семена с оболочкой, которая внешне выглядит как нормально развитая, одревесневшая, однако является мягкой и легко разламывается, внутри — остатки дегенерировавшего мегagamетофита (рис. 8). Таких семян было 1,7 %;

— семена с плотной одревесневшей оболочкой, нормального размера, содержимое занимает 2/3 объема семени, окраска — от кремовой до коричневой. На эмбриологических препаратах видно, что в семенах развиваются множественные глобулярные зародыши. Доля таких семян — 33,3 %;

— семенные чешуи, в базальной части которых сохранились плоские мелкие остатки неопыленных семязачатков или семязачатков,

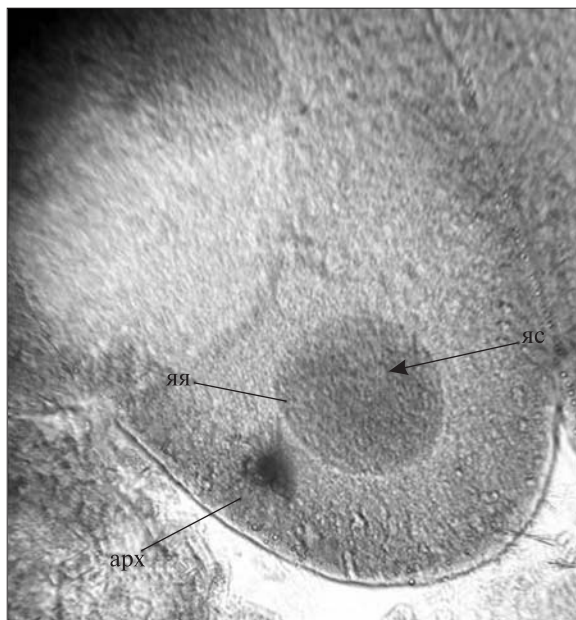


Рис. 4. Слияние ядра яйцеклетки и ядра спермия: арх — архегоний; яс — ядро спермия; яя — ядро яйцеклетки

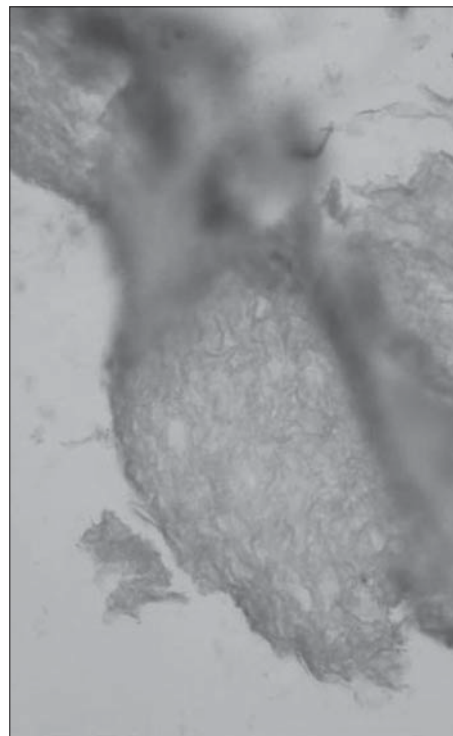


Рис. 5. Один развивающийся зародыш

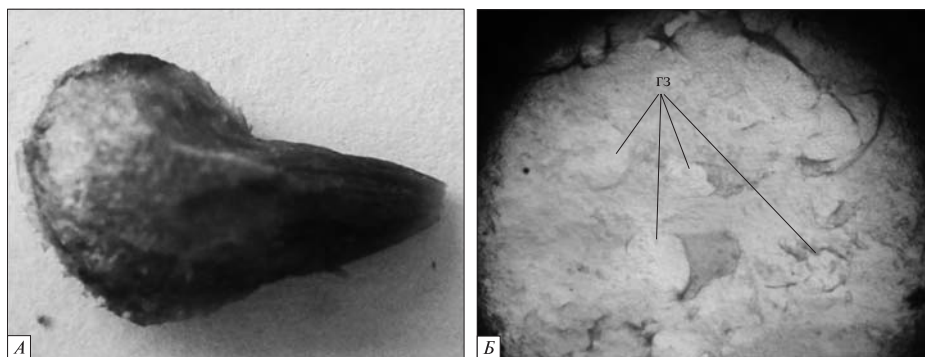


Рис. 6. Содержимое семени, дегенерировавшее вскоре после оплодотворения: *А* — внешний вид; *Б* — временный препарат просветленного семязачатка; гз — глобулярный зародыш

дегенерировавших вскоре после опыления. Доля таких чешуй составляла 24,5 % от общего количества фертильных семязачатков.

В I декаде июля в семенах *P. sibirica* содержится дифференцированный зародыш, который занимает около 1/4 длины коррозионной полости и имеет зачаточный корешок, продолжением которого являются остатки суспензор-

ной системы, ось гипокотиль — побег и апекс побега, окруженный семядолями (рис. 9).

Определение качества семян *P. sibirica* на более поздних этапах развития в насаждениях на территории НБС им. Н.Н. Гришко затруднено, поскольку, начиная со II декады июня, большая часть шишек, содержащих семена с формирующимися зародышами, поедается белками и для анализа остаются доступными только единичные шишки.

Обсуждение

Поскольку *P. sibirica* является одной из основных лесообразующих пород в Сибири, изучению особенностей плодоношения данного вида в условиях естественного произрастания уделялось большое внимание [3, 8, 10, 13]. Сравнение полученных нами данных в условиях Киева с данными И.Н. Третьяковой [13], полученными в Западном Саяне, показало, что в целом процессы развития репродуктивных структур *P. sibirica* в условиях интродукции проходят так же, как и в условиях естественного произрастания. При этом отмечены некоторые отличия морфометрических показателей и существенные различия в календарных сроках прохождения процессов. Так, по данным И.Н. Третьяковой, согласующимися с данными из других регионов [8, 9], в условиях естественного произрастания высота пыльцевых зерен составляет от 40 до 47 мкм, тогда как в условиях Киева этот показатель

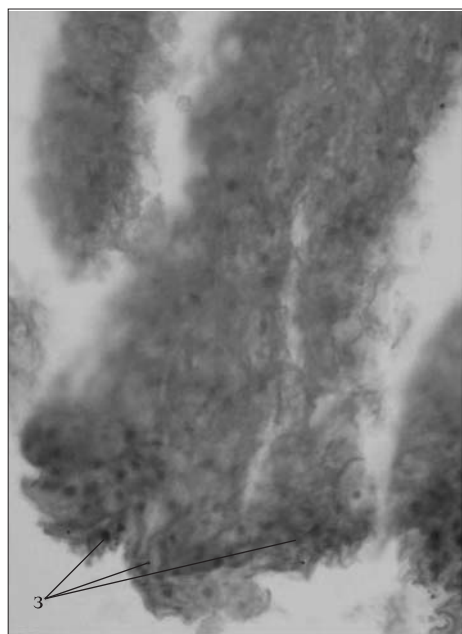


Рис. 7. Несколько глобулярных зародышей в ткани женского гаметофита: з — зародыш

несколько ниже — от 37,8 до 43,0 мкм, при этом размеры воздушных мешков не отличаются. Вылет пыльцевых зерен в условиях Киева происходит на месяц раньше, чем в условиях естественного произрастания. Меньшие размеры пыльцевых зерен могут объясняться более быстрыми темпами прохождения процессов при формировании мужского гаметофита. Развитие женских генеративных структур до опыления в условиях интродукции происходит за два вегетационных сезона. К моменту опыления семязачатки находятся на той же стадии развития, что и в условиях естественного произрастания. В то же время количество фертильных семенных чешуй в женской шишке в условиях интродукции значительно меньше — 12–24 на шишку, тогда как в условиях естественного произрастания — 25–30. По мнению некоторых исследователей, формирование меньшего количества генеративных структур может быть обусловлено недостатком пластических ресурсов [2].

До момента опыления развитие женских генеративных структур в условиях Киева происходило без отклонений. Мы не встречали в литературе сведений и не наблюдали формирование недоразвитых семязачатков, не способных к приему пыльцы, у *P. sibirica*. Такие недоразвитые семязачатки описаны для *Pinus monticola* Dougl. ex D. Don. Сообщается, что

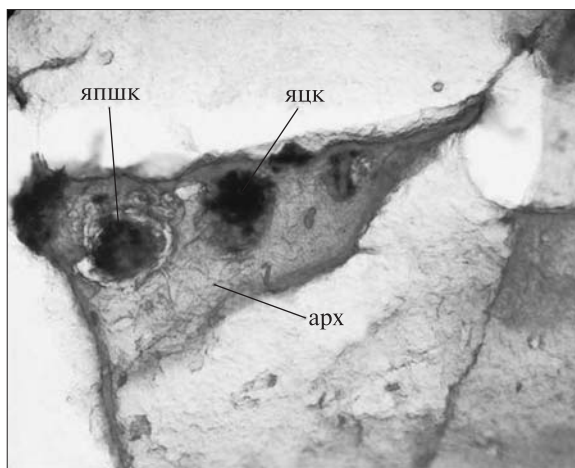


Рис. 8. Дегенерирующий архегоний в опыленном семязачатке: арх — архегоний; япшк — ядро первичной шейковой клетки; яцк — ядро центральной клетки

около 30 % семязачатков у этого вида могут дегенерировать еще до опыления [21]. Оплодотворение и эмбриогенез происходят в разные вегетационные сезоны по типу, характерному для большинства видов семейства *Pinaceae* [23]. Развитие семян от опыления до созревания длится около 15 мес.

Процесс опыления является одним из критических этапов репродуктивного цикла многих растений [14], что мы наблюдали и у *P. sibirica* в условиях Киева. Количество неопыленных семязачатков значительно варьировало

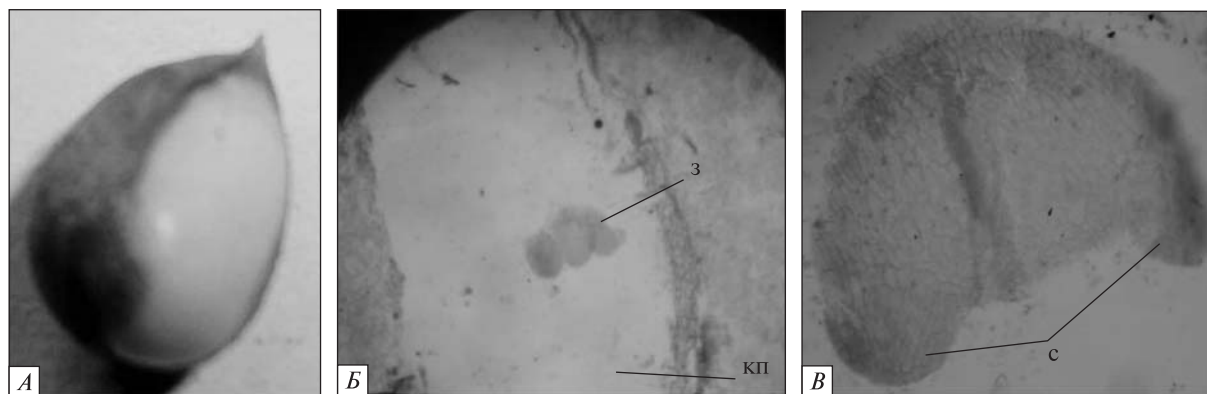


Рис. 9. Нормально развитое семя в I декаде июля: А — внешний вид (часть одревесневшей оболочки удалена); Б — коррозионная полость с частью зародыша; В — верхушечная часть зародыша; з — зародыш; кп — коррозионная полость; с — семядоли

ло у разных деревьев и составляло от 12,5 до 43,7 % (в среднем — 24,5 %). Подобное явление не отмечено в литературе о семенной продуктивности *P. sibirica* в условиях естественного произрастания, однако обсуждается для других видов орехоносных сосен. Так J. Owens et al. [22] указывают, что для *Pinus albicaulis* Engelm. в условиях естественного произрастания доля неопыленных семязачатков составляет около 6 %. У *P. contorta* Dougl., если опылилось менее 80 % фертильных семязачатков в шишке, то шишка вскоре после опыления опадает. В искусственных насаждениях *P. contorta* на сухих открытых склонах в отдельные годы наблюдали выраженную протерандрию, что было одной из причин недоопыленности семязачатков. Авторы, изучавшие семенную продуктивность ряда североамериканских видов рода *Pinus*, отмечают, что наибольшая потеря семян происходит в результате формирования частично полных, но нежизнеспособных семян. Такие семена могут прекратить развитие незадолго до оплодотворения, во время оплодотворения или в ходе развития зародыша. Ранее [17] их объединяли в одну категорию — «пустые семена», хотя они различаются по содержанию.

Поскольку анализ семенной продуктивности мы проводили во второй половине июня, то однозначных выводов о качестве зрелых семян сделать нельзя, но уже на этом этапе развития 47,3 % семян — это оплодотворенные семязачатки, развитие которых остановилось на ранних этапах развития. Изучение хвойных растений за последние 70 лет показало, что основной причиной дегенерации зародышей на ранних стадиях является высокий уровень самоопыления [17, 20]. Также значительной была доля семян с темной окраской тканей женского гаметофита и множеством глобулярных зародышей (33,3 %). Семена с разной окраской тканей женского гаметофита, но без зародышей, которые дегенерировали еще до начала раннего эмбриогенеза, описаны для *P. contorta* [21]. Высказано предположение, что окрашивание тканей может быть результатом выделения энзимов насеко-

мыми [16] или микроорганизмами. Изучение незначительного количества семян в I декаде июля показало, что в это время в нормально развивающихся семенах уже имеется дифференцированный зародыш, не достигший нормального размера. Можно предположить, что полное вызревание зародыша *P. sibirica* в условиях Киева завершается в августе—сентябре, что соответствует данным о созревании семян этого вида в условиях естественного произрастания на территории Китая [18].

Выводы

1. У *P. sibirica* в условиях Киева развитие мужских и женских генеративных структур происходит без отклонений. Формируется достаточное количество жизнеспособной пыльцы и фертильных семязачатков.

2. Несмотря на достаточное количество пыльцевых зерен, от 12,5 до 43,7 % семенных зачатков остаются неопыленными. Выяснение причин недостаточного опыления требует дополнительных исследований.

3. Развитие семязачатков и семян после опыления происходит за два вегетационных сезона. Вскоре после опыления и на ранних этапах эмбриогенеза погибает 47,3 % семязачатков, что, вероятно, связано с большой частотой самоопыления.

4. Шишки и семена в условиях Киева повреждаются насекомыми.

5. В I декаде июля семена уже содержат дифференцированный зародыш, который до прорастания должен завершить внутрисеменное развитие, что может быть достигнуто путем правильно подобранных режимов стратификации.

1. Древесные породы мира. Т. 3. Древесные породы СССР / Под ред. К.К. Калущкого. — М.: Лесн. пром-сть, 1982. — 262 с.
2. Злобин Ю.А. Проблемы репродуктивной биологии семенных растений // Сб. статей. — СПб., 1993. — Вып. 8. — С. 8–15.
3. Ирошников А.И. Плодоношение кедра в Западном Саяне // Тр. Ин-та ИЛИД СО АН СССР. — М.: Изд-во АН СССР, 1963. — С. 104–119.
4. Клімат Києва / Осадчий В.І., Косовець О.О., Бабіченко В.М. — К.: Ніка-Центр, 2010. — 317 с.

5. Крылов Г.В., Таланцев Н.К., Козаков Н.Ф. Кедр. — М.: Лесн. пром-сть, 1983. — 216 с.
6. Методики просветления семязачатков люцерны (Экспресс-методы определения фертильности зародышевых мешков люцерны): Метод. указания. — Л., 1988. — 25 с.
7. Некрасов В.И. Некоторые теоретические вопросы формирования интродукционных популяций лесных древесных пород // Лесоведение. — 1971. — № 5. — С. 26–31.
8. Некрасова Т.П. Биологические основы семенования кедра сибирского. — Новосибирск: Наука, СО АН СССР, 1972. — 272 с.
9. Николаева А.Н. Жизнеспособность пыльцы кедра сибирского Западного Саяна // Лесоведение. — 1974. — № 3. — С. 59–63.
10. Новоселова Н.В. Закономерности эмбриогенеза и формирования семян сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) in vivo и в культуре in vitro: Автореф. ... канд. биол. наук. — Красноярск, 2003. — 22 с.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
12. Токарський О.Ф. Інтродукція рослин Алтаю // Інтродукція на Україні корисних рослин природної флори СРСР. — К., 1972.
13. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных. Физиологические аспекты. — Новосибирск: Наука, СО АН СССР, 1990. — 155 с.
14. Шевченко С.В. Репродуктивная биология декоративных и субтропических плодовых растений Крыма. — К.: Аграрна наука, 2009. — 335 с.
15. Ярославцев Г.Д., Булыгин Н.Е., Кузнецов С.И., Захаренко Г.С. Фенологические наблюдения над хвойными: Метод. указания — Ялта, 1973. — 48 с.
16. Bates S.L., Borden J.H., Savoie A. et al. Impact of feeding by *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae) on the major storage reserves of mature Douglas-fir (*Pinaceae*) seeds // Can. Entomol. — 2000. — 132. — P. 91–102.
17. Dogra P.D. Seed sterility and disturbances in the embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in *Pinaceae* // Studia For. Suec. — 1967. — N 15. — P. 5–96.
18. Flora of China [http://www.efloras.org]
19. Gauthier S., Bergeron Y., Simon J.-P. Cone serotiny in jack pine: ontogenetic, positional, and environmental effects // Can. J. For. Res. — 1993. — Vol. 23. — P. 394–401.
20. Owens J.N., Bennett J., L'Hirondelle S. Pollination and cone morphology affect cone and seed production in lodgepole pine seed orchards // Ibid. — 2005. — 35. — P. 383–400.
21. Owens J.N., Fernando D.D. Pollination and seed production in western white pine // Ibid. — 2007. — 37. — P. 260–275.
22. Owens J.N., Thanong Kittirat, Mahalovich M.F. White-bark pine (*Pinus albicaulis* Engelm.) seed production in natural stands // Forest Ecology and Management. — 2008. — 255, N 3-4. — P. 803–809.
23. Singh H. Embryology of Gymnosperme. Encyclopedia of Plant Anatomy X (2). — Berlin, Stuttgart, 1978. — 304 p.
24. Szykh A., Voronin V. Current vegetation dynamics of the “forest-mountain tundra” ecotones of Lake Baikal coastal ranges // Natural Science. — 2013. — 5, N 2. — P. 187–193.

Поступила в редакцію 27.12.2013 г.

Рекомендовала к печати С.В. Клименко

Г.І. Ругузова², О.П. Похильченко¹

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Україна, м. Київ

² Нікітський ботанічний сад — Національний науковий центр НААН України, Україна, АР Крим, м. Ялта, смт Нікіта

ЕМБРИОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ФОРМУВАННЯ НАСІННЯ *PINUS SIBIRICA* DU TOUR В УМОВАХ КИЄВА

Розглянуто особливості репродуктивного циклу та насінну продуктивність сосни сибірської (*Pinus sibirica* Du Tour) в умовах інтродукції. Наведено деякі морфометричні параметри репродуктивних структур та календарні строки проходження процесів під час формування насіння.

Ключові слова: *Pinus sibirica*, пилокві зерна, жіночі шишки, насіннєві зачатки, запилення, запліднення, насіння.

А.І. Ругузова², О.П. Pokhylchenko¹

¹ М.М. Gryshko National Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Kyiv

² Nikitsky Botanical Gardens — National Scientific Center, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita

EMBRYOLOGICAL FEATURES OF *PINUS SIBIRICA* DU TOUR SEEDS FORMATION IN KYIV

This article discusses some peculiarities of *Pinus sibirica* Du Tour reproduction cycle and seed productivity in the introduction conditions. Some morphometric parameters of reproductive structures and calendar terms for processes during the seed formation are given.

Key words: *Pinus sibirica*, pollen grains, female cones, ovules, pollination, fertilization, seeds.