

УДК 582.47:58.085:581.162.41

**СУРСО Михаил Вольдемарович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии популяций и сообществ Института экологических проблем Севера Уральского отделения РАН (г. Архангельск). Автор 61 научных публикаций, в т. ч. двух монографий

**ДЕМИДОВА Наталья Анатольевна**, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе Северного научно-исследовательского института лесного хозяйства (г. Архангельск). Автор 80 научных публикаций

### **ПРОРАСТАНИЕ *IN VITRO* ПЫЛЬЦЫ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*JUNIPERUS COMMUNIS L.*)\***

Описана морфология гидратированных пыльцевых зерен можжевельника обыкновенного. Приводятся результаты изучения процессов гидратации пыльцевых зерен, механизма сбрасывания экзины и начала микрогаметофитогенеза можжевельника обыкновенного *in vitro*. Показана связь этих процессов с особенностями морфологии пыльцевых зерен можжевельника.

**Ключевые слова:** можжевельник, пыльцевое зерно, пыльцевая трубка, гидрофильная капсула, орбиккулы.

Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок являются важнейшими этапами половой репродукции у растений. У голосеменных пыльцевая трубка функционально служит средством доставки спермиев к яйцеклетке, в пыльцевой же трубке голосеменных происходят заключительные этапы микрогаметофитогенеза, или, как у можжевельника обыкновенного, весь процесс микрогаметофитогенеза протекает в развивающихся пыльцевых трубках.

Пыльцевая трубка не является «классической» растительной клеткой, а представляет

цилиндрический протуберанец, который формируют пыльцевые зерна, попадая на мегаспорангий [12]. В лабораторных условиях часто достаточно просто добиться формирования пыльцевых трубок и осуществлять с ними различного рода манипуляции. Поэтому они служат идеальной моделью для изучения физиолого-биохимических и структурно-динамических процессов в растительных клетках, таких, как, например, полярность и апикальный рост клеток, движение органелл и цитоплазмы, формирование цитоскелета [8, 9, 11].

---

\* Электронно-микроскопические исследования и флуоресцентная микроскопия выполнены на оборудовании ЦКП НО «Арктика» Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Минобрнауки России

© Сурсо М.В., Демидова Н.А., 2013

Изучение микрогаметогенеза *in vitro* у голосеменных представляет определенные методические трудности, поскольку связано чаще всего с необходимостью длительного периода инкубирования пыльцевых трубок. Полное развитие пыльцевой трубки (от начала формирования трубки до образования спермиев) у можжевельника обыкновенного *in vivo* составляет около 45 дней [2].

У Cupressaceae зрелая пыльца обычно двухклеточная [7], однако пыльцевое зерно можжевельника обыкновенного является одноклеточной структурой, т. е. представляет собой не проросшую в микрогаметофит микроспору, и функционирует как антеридиальная инициаль. Деление ядра микроспоры происходит уже при прорастании ее в пыльцевую трубку. В результате этого деления образуются генеративная клетка и клетка трубки. Последующее деление генеративной клетки приводит к образованию двух одинаковых по размерам ядер, каждое из которых формирует собственную мембрану и клеточную стенку, образуя два равных по размерам спермия [10]. Таким образом, у Cupressaceae спермии являются клеточными структурами.

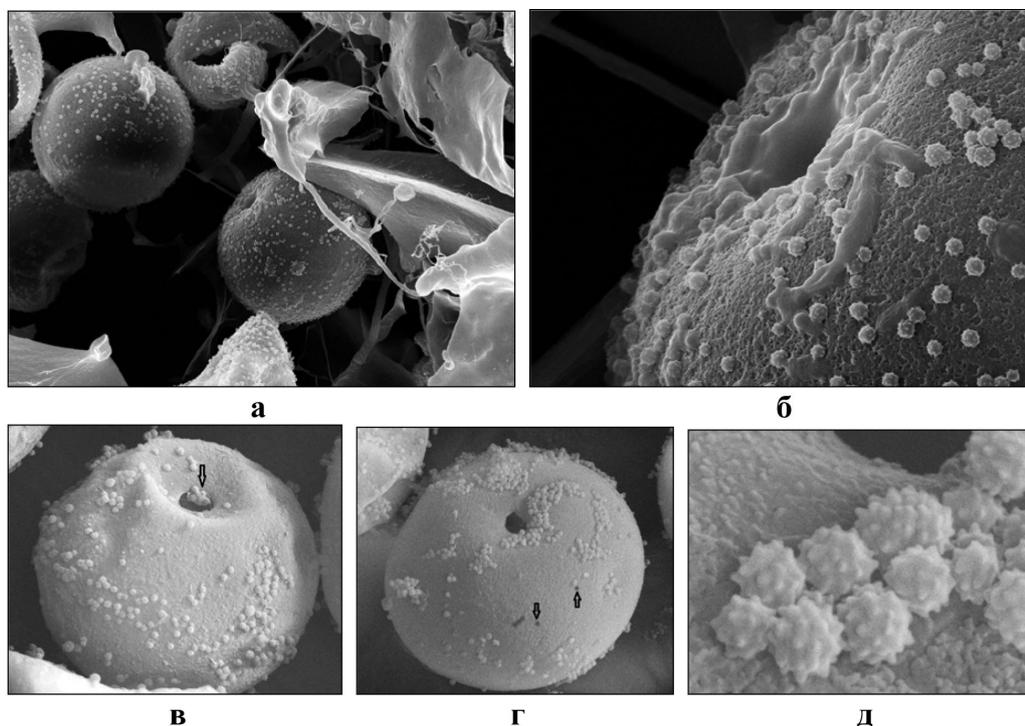
Микрогаметофитогенез у *Juniperus* L. изучен недостаточно полно. Это связано с определенными методическими трудностями исследований метаморфозов клеточных и ядерных структур микрогаметофитов *in vivo* и при культивировании пыльцевых трубок *in vitro*. Известно всего несколько экспериментальных работ по микрогаметофитогенезу *in vitro* у *Juniperus communis* [1, 4–6]. Методика культивирования пыльцевых трубок *Juniperus* L. *in vitro* рассмотрена в ряде статей [3].

**Материал и методика.** При проведении светомикроскопических исследований гидратированной пыльцы в каплю водной суспензии пыльцы добавляли каплю 0,5 %-ного водного раствора метилового зеленого – пиронина G, сафранина, хромового темно-синего или другого красителя. Просмотр и фотографирование препаратов производили при помощи светового лабораторного микроскопа AxioScore

A1 (Zeiss) в комплекте с цифровой камерой Canon G10. Флуоресцентную микроскопию гидратированных пыльцевых зерен можжевельника производили на исследовательском микроскопе Axio Imager M2 (Zeiss). В каплю водной суспензии пыльцы добавляли каплю слабого водного раствора акридинового оранжевого, трипафлавина, флуоресцеина или другого флуорохрома и просматривали препарат при разных режимах флуоресценции. Использовали светофильтры 20 Rhod (возбуждение 546 нм, эмиссия 575–640 нм, красная флуоресценция), 49 DAPI (возбуждение 365 нм, эмиссия 420–470 нм, синяя флуоресценция) или 38 GFP (возбуждение 470 нм, эмиссия 525–50 нм, зеленая флуоресценция). При проведении электронно-микроскопических исследований гидратированную пыльцу можжевельника лиофильно высушивали и, после напыления технического золота просматривали на сканирующем электронном микроскопе Sigma-Zeiss при разных режимах увеличения. Для проращивания пыльцы использовали жидкие среды ( $dH_2O$  или слабый водный раствор сахарозы) и агаровый субстрат с добавлением 5 %-ной сахарозы. Проращивание пыльцы производили в термостате при +26,5 С°.

**Результаты и обсуждение.** Пыльцевые зерна можжевельника лишены воздушных мешков и имеют почти правильную сферическую форму. Диаметр среднестатистического пыльцевого зерна составляет около 25 мкм. Поверхность сэкзины пыльцевого зерна можжевельника мелко гранулированная, покрыта многочисленными орбикулами диаметром 450–650 нм, имеющими сферическую форму (рис. 1).

Пыльцевые зерна можжевельника имеют одну функциональную пору (дистальную апертуру), которая у сухой пыльцы часто закрыта скоплениями орбикул, и не видна. По мнению Е. Дьюо [6] эта крошечная пора у *Juniperus communis* L. прикрыта крышечкой. При более внимательном рассмотрении видно, что орбикулы имеют шипики, при помощи которых непрочно удерживаются на поверхности пыльцевого зерна. В результате гидратации пыльцевого зерна

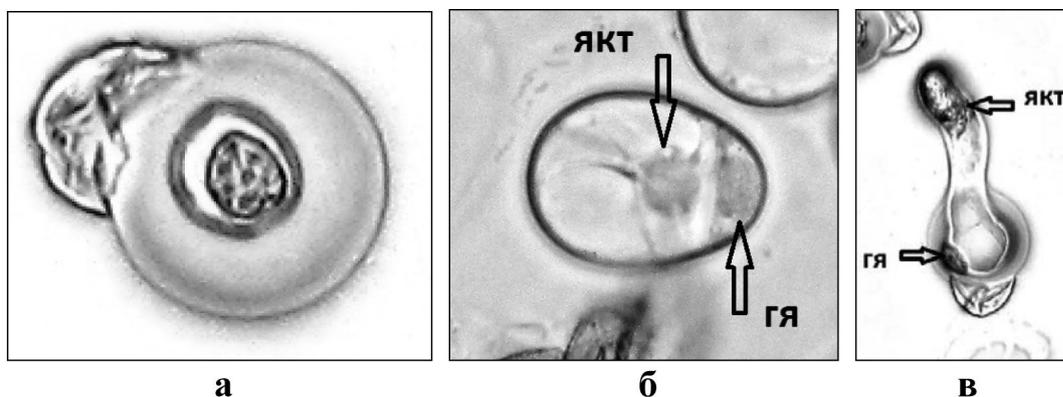


**Рис. 1.** Поверхность экзины гидратированных пыльцевых зерен можжевельника (а – пыльцевые зерна образовали гидрофильные капсулы и сбросили экзину, видны деформированные остатки гидрофильных капсул, разорвавшихся в результате лиофильной сушки; б – функциональная пора и орбикулы на поверхности экзины пыльцевого зерна; в – скопление орбикул, прикрывающих функциональную пору (показано стрелкой); г – стрелками указаны перфорации, образованные оторвавшимися от поверхности пыльцевого зерна орбикулами; д – орбикулы на поверхности пыльцевого зерна можжевельника рядом с функциональной порой при большом увеличении)

орбикулы, закрывавшие пору, отрываются, высвобождая ее. Кроме функциональной поры в оболочке пыльцевого зерна можжевельника после его гидратации появляются еще более крошечные перфорации (*рис. 1г*), которые образуются в результате отрывания части орбикул от поверхности пыльцевого зерна.

Первые метаморфозы пыльцевого зерна можжевельника после высева на питательную среду происходят в результате гидратации пыльцы. Эти метаморфозы не связаны с прорастанием пыльцевого зерна в пыльцевую трубку, а обусловлены сбрасыванием экзины. Процедура сбрасывания экзины протекает весьма динамично. При гидратации пыльцы вода ос-

мотическим путем всасывается через функциональную пору внутрь пыльцевого зерна. В результате между внутренней поверхностью эндонэзины и внутренней интиной микроспоры (будущей стенкой пыльцевой трубки) образуется кольцо (водяной слой). Внешняя граница этого кольца отграничена от внутренней поверхности эндонэзины элементарной полупроницаемой мембраной. Таким образом, формируется гидрофильная капсула, которая очень быстро увеличивается в объеме и с все возрастающим усилием своей стенкой давит на оболочку пыльцевого зерна. Под растущим тургором наружной стенки быстро увеличивающей свой объем гидрофильной капсулы экзи-

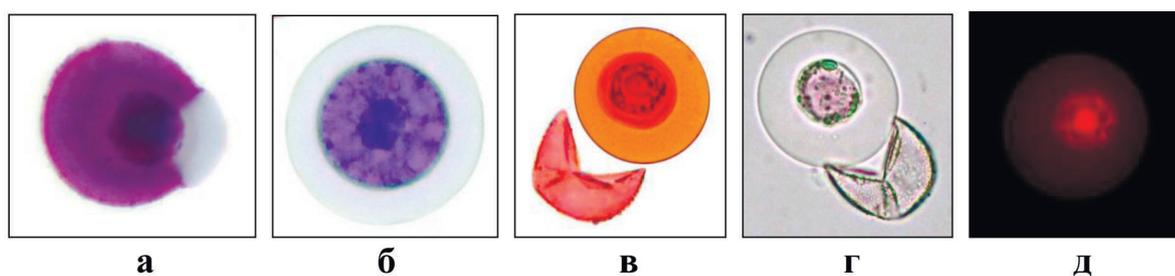


**Рис. 2.** Прорастание пыльцы можжевельника обыкновенного *in vitro*: а – образование гидрофильной капсулы и сбрасывание экзины пыльцевого зерна; б – двухклеточный микрогаметофит; в – сформировавшаяся пыльцевая трубка (видна сброшенная экзина, кончик пыльцевой трубки выходит из гидрофильной капсулы, не прорывая ее стенки). Пыльца прорастивалась на агаровой среде с добавлением сахарозы (а, в) и в  $dH_2O$  методом «висячей капли» (б); гя – генеративное ядро, якт – ядро клетки трубки

на пыльцевом зерне вскрывается двумя равными створками, и сбрасывается (рис. 2а).

Более точно интерпретировать механизм сбрасывания экзины можно следующим образом. Гидрофильная капсула начинает выходить через функциональную пору и, после того, как створки оболочки пыльцевого зерна раздвинутся достаточно широко, экзина очень быстро сползает с гидрофильной капсулы. Начало этого процесса зафиксировано на рис. 3а.

Диаметр дистальной апертуры пыльцевого зерна можжевельника намного меньше диаметра гидрофильной капсулы с находящейся внутри нее микроспорой. Экзина пыльцевого зерна можжевельника довольно толстая и, по-видимому, достаточно прочная. Вероятно, разрыв экзины во многом обусловлен наличием перфораций, появляющихся в местах прикрепления орбикул при гидратации пыльцевого зерна. Локализация орбикул на поверхности



**Рис. 3.** Результаты окрашивания гидратированных пыльцевых зерен можжевельника метиловым зеленым – пиронином G (а, б), сафранином (в), хромовым темно-синим (г) и характер флуоресценции микроспоры и гидрофильной капсулы при окрашивании акридиновым оранжевым (д). На левой фотографии (а) показана начальная стадия формирования гидрофильной капсулы и сбрасывания экзины пыльцевого зерна. После сбрасывания экзины (в, г) еще не проросшая в микрогаметофит микроспора находится внутри гидрофильной капсулы (б–д)

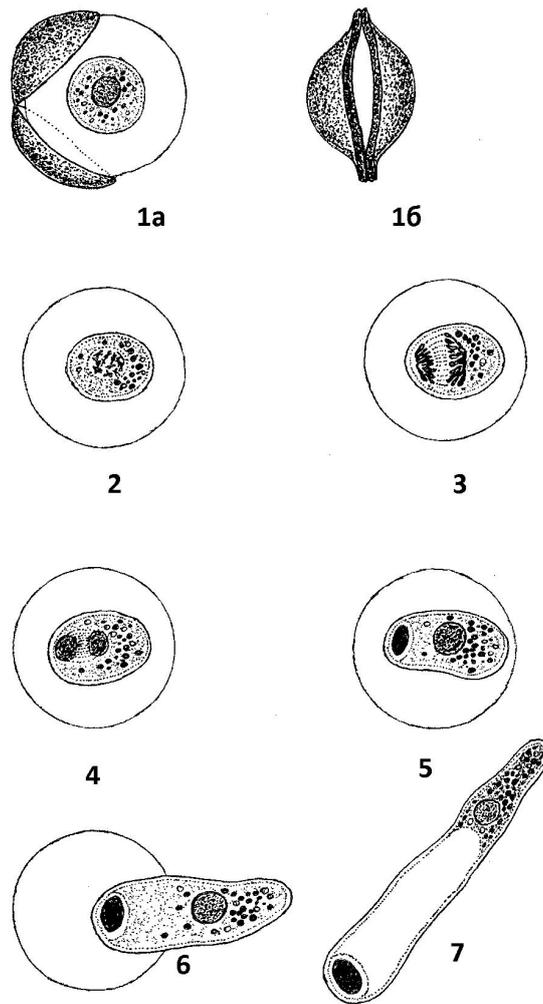
сэкины пыльцевого зерна можжевельника лишена какой-либо упорядоченности. Однако, поскольку гидрофильная капсула представляет шар практически идеальной формы, давление ее стенок почти равномерное по всей площади внутренней поверхности эндонэкины. Поэтому разрыв экины происходит в районе дистальной апертуры, при этом края образовавшихся створок получаются идеально ровными.

То, что гидрофильная капсула имеет собственную наружную стенку в виде мембраны, подтверждается результатами окрашивания гидратированных пыльцевых зерен можжевельника (рис. 3в, г). Так, четкие внешние контуры капсулы проявляются при окрашивании водными растворами бенгальского розового, гематоксилина – железо-аммонийных квасцов – хлоралгидрата, йод – калий йод – хлоралгидрата, конго красного, сафранина, хромового темно-синего, эриохрома черного и ряда других красителей. Это подтверждается также наличием останков, образовавшихся в результате лиофильной сушки гидратированной пыльцы (рис. 1а). Характер флуоресценции (рис. 3д) свидетельствует о том, что содержимое капсулы представляет собой слабый электролит неопределенного химического состава.

Прорастание микроспоры в микрогаметофит начинается еще внутри гидрофильной капсулы, и связано с профазой первого митоза (рис. 4). После образования двухклеточного микрогаметофита начинается постепенная трансформация его в пыльцевую трубку, которая приобретает сначала овальную, затем туфелькообразную форму, но все еще целиком вмещается в гидрофильную капсулу. Генеративная клетка остается в дистальной части трубки, а ядро сифоногенной (клетки-трубки) клетки постепенно перемещается ближе к ее проксимальному кончику, занимая центральное место в субапикальной «активной» зоне трубки.

Постепенно растущий кончик пыльцевой трубки достигает наружного края гидрофильной капсулы и выходит из нее, не прорывая ее стенки. Сама капсула спустя какое-то время

лизирует, не оставляя на питательной среде видимых следов, но может лизировать и раньше, еще до начала выхода из нее пыльцевой трубки. С началом роста пыльцевой трубки вокруг ядра сифоногенной клетки осуществляется интенсивный синтез полисахаридов и липидов,



**Рис. 4.** Схема, иллюстрирующая начальную стадию прорастания пыльцы и формирования пыльцевых трубок можжевельника обыкновенного: 1а – образование гидрофильной капсулы и сбрасывание экины пыльцевого зерна; 1б – сброшенная экина; 2 – профазы первого митоза микроспоры; 3 – анафазы; 4 – телофазы; 5–7 – образование 2-клеточного гаметофита и формирование пыльцевой трубки

которые концентрируются в проксимальном кончике трубки. Цитоплазма в дистальной части трубки сохраняет оптическую прозрачность, в дистальном же кончике трубки остается и генеративная клетка микрогаметофита (рис. 2 и 4).

### Список литературы

1. Сурсо М.В. Микроспорогенез, опыление и микрогаметогенез у *Juniperus communis* (Cupressaceae) // Бот. ж. 2012. Т. 97. № 2. С. 211–221.
2. Сурсо М.В. Морфогенез и феноритмика женских репродуктивных структур можжевельника обыкновенного в северной тайге // Лесоведение. 2013. № 2. С. 58–64.
3. Djavanshir K., Fechner G.H. Pollen Germination and Pollen Tube Growth of *Juniperus* from Autumn and Winter Collections // *Silvae Genet.* 1975. Vol. 24. № 1. P. 26–29.
4. Duhoux E. Structural Growth of the Wall of the Pollen Grain of *Juniperus communis* (Cupressaceae), Growth *in vitro* During the Hydration Phase // *Comptes Rendus Des Seances Hebdomadaires De L'Academie Des Sciences, France, D.* 1972. Vol. 274. № 20. P. 2767–2770.
5. Duhoux E. The Division of the Reproductive Cell and the Release of its Products in the Pollen Tubes of *Juniperus communis* and *Cupressus arizonica* // *Revue Generale De Botanique.* 1974. Vol. 81. № 962/963/964. P. 193–204.
6. Duhoux E. Mechanism of Exine Rupture in Hydrated Taxoid Type of Pollen // *Grana.* 1982. Vol. 21. P. 1–7.
7. Fernando D.D., Lazzaro M.D., Owens J.N. Growth and Development of Conifer Pollen Tubes // *Sex. Plant. Reprod.* 2005. Vol. 18. P. 149–162.
8. Franklin-Tong V.E. Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth // *The Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 727–738.
9. How Pollen Tubes Grow (Review) / A. Krichevsky, S.V. Kozlovsky, G.-W. Tian, M.-H. Chen, A. Zaltsman, V. Citovsky // *Developmental Biology.* 2007. Vol. 303. P. 405–420.
10. Male Gametophyte Development and Evolution in Extant Gymnosperms / D.D. Fernando, Ch.R. Quinn, E.D. Brenner, J.N. Owens // *International J. Plant Developmental Biol.* 2010. Vol. 4. P. 47–63.
11. Mascharenhas J.P. Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation // *The Plant Cell.* 1993. Vol. 5. P. 1303–1314.
12. Pollen Cytoskeleton During Germination and Tube Growth / G. Cai, Del C. Casino, S. Romagnoli, M. Cresti // *Current Science.* 2005. Vol. 89. № 11. P. 1853–1860.

### References

1. Surso M.V. Mikrosporogenez, opylenie i mikrogametogenez u *Juniperus communis* (Cupressaceae) [Microsporogenesis, Pollination and Microgametogenesis in *Juniperus communis* (Cupressaceae)]. *Botanicheskiy zhurnal*, 2012, vol. 97, no. 2, pp. 211–221.
2. Surso M.V. Morfogenez i fenoritmika zhenskikh reproductivnykh struktur mozhzhevel'nika obyknovennogo v severnoy tayge [Morphogenesis and Phenological Rhythms of Female Reproductive Structures in Common Juniper in the Northern Taiga Subzone]. *Lesovedenie*, 2013, no. 2, pp. 58–64.
3. Djavanshir K., Fechner G.H. Pollen Germination and Pollen Tube Growth of *Juniperus* from Autumn and Winter Collections. *Silvae Genetica*, 1975, vol. 24, no. 1, pp. 26–29.
4. Duhoux E. Structural Growth of the Wall of the Pollen Grain of *Juniperus communis* (Cupressaceae), Growth *in vitro* During the Hydration Phase. *Comptes Rendus Des Seances Hebdomadaires De L'Academie Des Sciences.* France, D. 1972, vol. 274, no. 20, pp. 2767–2770.
5. Duhoux E. The Division of the Reproductive Cell and the Release of Its Products in the Pollen Tubes of *Juniperus communis* and *Cupressus arizonica*. *Revue Generale De Botanique*, 1974, vol. 81, no. 962/963/964, pp. 193–204.
6. Duhoux E. Mechanism of Exine Rupture in Hydrated Taxoid Type of Pollen. *Grana*, 1982, vol. 21, pp. 1–7.

7. Fernando D.D., Lazzaro M.D., Owens J.N. Growth and Development of Conifer Pollen Tubes. *Sex. Plant. Reprod.*, 2005, vol. 18, pp. 149–162.
8. Franklin-Tong V.E. Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth. *The Plant Cell*, 1999, vol. 11, pp. 727–738.
9. Krichevsky A., Kozlovsky S.V., Tian G.-W., Chen M.-H., Zaltsman A., Citovsky V. How Pollen Tubes Grow (Review). *Developmental Biology*, 2007, vol. 303, pp. 405–420.
10. Fernando D.D., Quinn Ch.R., Brenner E.D., Owens J.N. Male Gametophyte Development and Evolution in Extant Gymnosperms. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2010, vol. 4, pp. 47–63.
11. Mascharenhas J.P. Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *The Plant Cell*, 1993, vol. 5, pp. 1303–1314.
12. Cai G., Del Casino C., Romagnoli S., Cresti M. Pollen Cytoskeleton During Germination and Tube Growth. *Current Science*, 2005, vol. 89, no. 11, pp. 1853–1860.

***Surso Mikhail Voldemarovich***

Institute of Ecological Problems of the North,  
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (Arkhangelsk, Russia)

***Demidova Natalya Anatolyevna***

Northern Research Institute of Forestry (Arkhangelsk, Russia)

### ***IN VITRO POLLEN GERMINATION OF COMMON JUNIPER (JUNIPERUS COMMUNIS L.)***

The paper describes the morphology of hydrated common juniper pollen grains. In addition, it presents the results of studying the processes of pollen grain hydration, the mechanism of exine rupture and the early stages of *in vitro* microgametophytogenesis of common juniper. Correlation of these processes with peculiarities of juniper pollen grain morphology is shown.

***Keywords:*** juniper, pollen grain, pollen tube, hydrophilic capsule, orbicules.

*Контактная информация:*

Сурсо Михаил Вольдемарович

*Адрес:* 163061, Архангельск, наб. Северной Двины, д. 23

*e-mail:* surso@iepn.ru

Демидова Наталья Анатольевна

*Адрес:* 163002, Архангельск, ул. Никитова, д. 13

*e-mail:* forestry@ptl-arh.ru

Рецензент – *Болотов И.Н.*, доктор биологических наук, заместитель директора по научным вопросам Института экологических проблем Севера Уральского отделения РАН (г. Архангельск)