

УДК: 581.3 581.331.2

ТЕМПЫ РАЗВИТИЯ СПОРОДЕРМЫ У *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L. И *ARISTOLOCHIA MANSHURIENSIS* KOM.

С.В. Полева¹

Два вида кирказона отличаются по типу микроспорогенеза и по времени формирования апертур в процессе развития спородермы. *Aristolochia clematitidis* L. проходит мейоз по сукцессионному типу и формирует апертуру на самом последнем этапе формирования спородермы, при созревании интины. *A. manshuriensis* Kom. имеет симультанный микроспорогенез и начинает формировать апертурные области на средней тетрадной стадии, но эндэкина и интина формируются без апертурных областей. Сильное растягивание процесса формирования интины на последних этапах развития позволяет пыльцевым зернам *A. clematitidis* сформировать апертуру, которая изначально не закладывалась. У более «медлительных» на ранних этапах, вплоть до стадии инициации интины, пыльцевых зерен *A. manshuriensis* не хватает времени сформировать какие-либо апертуры при построении эндэкины и интины, и от их заложения на ранних этапах остаются только следы в виде сквозных щелей в эктэкине.

Ключевые слова: *Aristolochia clematitidis*, *Aristolochia manshuriensis*, пыльцевое зерно, апертура, развитие спородермы, длительность стадий развития спородермы.

Кирказон (*Aristolochia* L.) – крупный род семейства (*Aristolochiaceae*), входящего в одну из групп базальных цветковых – перечноцветных (Stevens, 2001). В роде *Aristolochia* описаны более 400 видов, распространенных от умеренных широт до тропиков обоих полушарий. В основном это деревянистые лианы, реже травы и кустарники. Зигоморфные цветки в виде кувшиничков содержат гиностегий и опыляются мухами (Nakonechnaya et al., 2008). Морфологические признаки и плоидность, проанализированные и сопоставленные с молекулярными маркерами, показали хорошее совпадение на уровне подродов и триб (Ohi-Toma et al., 2006). Выбранные для изучения виды *Aristolochia clematitidis* L. и *A. manshuriensis* Kom. относятся к разным подродам, однако их пыльцевые зерна описываются очень сходным образом как довольно крупные, сфероидальные, безапертурные с бугорчатой поверхностью (Erdtman, 1952).

Два вида кирказона отличаются по типу мейоза и по времени формирования апертур в сценарии развития спородермы. *A. clematitidis* проходит мейоз по сукцессионному типу и формирует апертуру на самом последнем этапе формирования спородермы, при созревании интины (Gonzalez et al., 2001, Polevova, 2015). *A. manshuriensis* имеет симультанный микроспорогенез и начинает фор-

мировать апертурные области на средней тетрадной стадии, но уже при формировании эндэкины в ней не выявляется никаких участков, которые можно было бы интерпретировать как апертурные. В дальнейшем формирование спородермы происходит точно так же, как у *A. clematitidis* (Полева, 2015). Все попытки обнаружить у *A. manshuriensis* спородерму зрелого типа, сходную с *A. clematitidis*, не увенчались успехом. В литературе имеются сведения об ультраструктуре спородермы еще двух видов: *A. fimbriata* (Furness et al., 2002) и *A. arborea* (Halbritter et al., 2017). Оба вида характеризуются как безапертурные и на опубликованных микрографиях эндэкина выглядит ламеллярной, как и в случае *A. manshuriensis*. Представляется интересным оценить темпы формирования сходных стадий развития спородермы у двух видов кирказона.

Материалы и методы

Бутоны *A. clematitidis* на разных стадиях развития были отобраны в ботаническом саду МГУ 26 мая 2011 г., 19 мая 2012 г. и 27 мая 2014 г. Бутоны *A. manshuriensis* были собраны в ботаническом саду МГУ 19 мая 2012 г., 29 мая 2014 г. и 2 июня 2015 г. Один образец *A. manshuriensis* получен из Ботанического сада-института ДВО РАН во Владивостоке, собран 3 июня 2015 г.

¹ Полева Светлана Вячеславовна – вед. науч. сотр. кафедры морфологии и систематики высших растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (svetlanapolevova@mail.ru).

И.М. Кошелевой. Бутоны отбирались по размерам от самых маленьких, где можно было видеть тетрады микроспор на давленных препаратах при световой микроскопии, до увядавших цветков, где невооруженным глазом были видны многочисленные пыльцевые трубки в открывшихся теках пыльников. Всего у *A. clematitidis* изучено 49 бутонов, а у *A. manshuriensis* – 68. Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) из бутонов выделяли гиностегии и фиксировали 2,5%-м глутаровым альдегидом на какодилатном буфере (рН 7,2) в течение 8 ч при 4 °С. Затем образцы дополнительно фиксировали 1%-м осмиевым фиксатором 2 ч при комнатной температуре, обезвоживали через серию спиртов и ацетона и заключали в смесь эпоновых смол (Миронов и др., 1994). С эпоновых блоков делали ультратонкие срезы на ультратоме «UC-5 Ultracut-R» («Leica Microsystems»), которые изучали на трансмиссионном электронном микроскопе «JEM-1011 TEM» («JEOL», Япония) при 80 кВ камерой «CCD GATAN ES500W» под управлением «Digital Micrograph GATAN» в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. При описаниях использовали терминологию Hesse et al. (2009).

При наличии большого числа бутонов на растениях в куртине материал отбирали в один прием. Сначала оценивали размер бутонов, в которых на давленных препаратах при световой микроскопии можно было различить тетрады микроспор, заключенные в каллозную оболочку. Считая этот размер наименьшим, с нескольких растений отбирали ряд бутонов, размеры которых постепенно увеличивались вплоть до увядающих цветков. Такой способ отбора проб предполагает уникальность стадии развития каждого бутона и их упорядоченность по мере развития микропоры и ее оболочки. В реальности размер бутона не строго коррелирует с определенной стадией микроспорогенеза (например, из-за различий в мощности материнских растений). Для уменьшения ошибок в интерпретации степени развития микроспор проводили ранжирование бутонов по стадиям развития, выделенным на качественном уровне. Количественные признаки (количество ламелл эндэкзины, толщина эндэкзины и интины) оценивали на качественном уровне. Выделенные стадии развития микроспор и их оболочек были хорошо согласованы с традиционно выделяемыми и характеризовали не единственный бутон, а несколько бутонов, которые соответствовали стадии на качественном уровне. Например, утолщение интины можно было бы определять тол-

щиной в микрометрах, однако существует большая вероятность ошибки из-за случайной, иногда косо, ориентации срезов. В результате большое число бутонов, в которых пыльцевые зерна формировали интину, были отнесены к одной из четырех стадий развития (инициация интины, мало интины, много интины и расслоение интины). Поскольку стадии для обоих видов оценивались по одним и тем же критериям, а относительное число бутонов на этих стадиях у двух видов отличалось, можно предположить, что чем больше бутонов отнесено к данной стадии, тем больше ее продолжительность и доступность для сбора проб. Стремительное прохождение каких-либо процессов уменьшает вероятность их попадания в выборку. Так, картины мейоза присутствовали в исследуемом материале по обоим видам, а митоза не удалось обнаружить ни у одного образца. Логично заключить, что мейоз занимает гораздо больше времени, чем митоз, о чем свидетельствуют прямые наблюдения (Bennett et al., 1977). При изучении методом ТЭМ для всех бутонов были определены стадии развития спородермы и подсчитано для каждого вида процентное содержание бутонов на той или иной стадии относительно их общего числа.

Результаты

Формирование микроспор начинается с мейоза (рис. 1). Мейоз у *A. manshuriensis* проходит примерно за то же время, что и у *A. clematitidis* (3 и 4% бутонов соответственно). Однако после мейоза *A. manshuriensis* довольно долго сохраняет ровную плазмалемму (6% бутонов), в то время как *A. clematitidis* проходит мейоз постепенно, и только в течение последовательных стадий мейоза плазмалемма становится ровной, без инвагинаций.

Следующая стадия характеризуется сильно волнистой плазмалеммой. Эта стадия у обоих видов также близка по длительности (по 4%), однако у *A. manshuriensis* под каллозной оболочкой элементов примэкзины еще не наблюдается, а апертурные области уже выявляются как места с ровной плазмалеммой, которую подстилают цистерны эндоплазматического ретикулаума. У *A. clematitidis* вся плазмалемма как будто вскипает, и в прогибах видна примэкзина в виде темных гранул, окруженных серым матриксом.

Следующая хорошо отличимая стадия характеризуется протостолбиками в примэкзине. У обоих видов она сравнима по длительности (1 и 2%) и облику с той лишь разницей, что у *A. manshuriensis* хорошо видны ровные участки голой плазмалеммы – апертурные области.







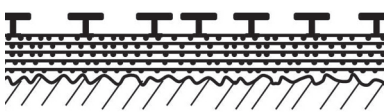
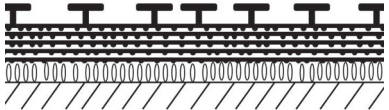
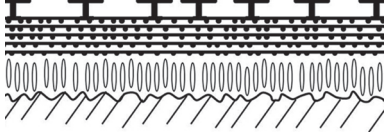
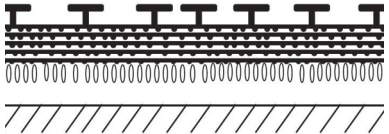
Схема строения оболочки	Номер стадии	Признаки стадий	Относительное количество бутонов, %	
			<i>A. clematitis</i>	<i>A. manshuriensis</i>
	1	ровная плазмалемма молодых микроспор	4	6
	2	плазмалемма волнистая, гранулы примэкины	4	4
	3	протостолбики и протопокров	2	7
	4	первая ламелла эндэкины	4	6
	5	мало эндэкины	2	6
	6	много эндэкины	2	10
	7	инициация интины	18	19
	8	мало интины	24	19
	9	много интины	22	12
	10	расслоение интины	14	9

Рис. 1. Схема стадий развития спородермы у двух видов кирказона и относительное количество бутонов на каждой стадии

На следующем этапе протостолбики соединены протопокровом. Такая стадия была выявлена только у *A. manshuriensis* (6%). Вероятно, у *A. clematitidis* протопокров формируется стремительно.

В конце тетрадного периода основания столбиков соединяются первой ламеллой с белой линией. Эту ламеллу принято интерпретировать как инициацию подстилающего слоя и эндэкины. На этой стадии *A. manshuriensis* пребывает дольше *A. clematitidis* (6 и 4% соответственно). Возможно, это связано с формированием апертурных участков у *A. manshuriensis*, так как в них помимо первой ламеллы с белой линией выявляются элементы покрова.

Постепенно ламеллы эндэкины подстраиваются изнутри. Пока их мало (до четырех) и между ними не выявляются гранулярные прослойки. У *A. manshuriensis* эта стадия длиннее, чем у *A. clematitidis* (6 и 2% соответственно), что, вероятно, связано с формированием у *A. manshuriensis* апертурной пробки. В этот момент каллозная оболочка растворяется, и начинается свободно-споровый период.

Когда ламелл эндэкины становится шесть–восемь, между ними становятся хорошо заметны гранулярные прослойки. *A. manshuriensis* проходит эту стадию дольше *A. clematitidis* (10 и 2% соответственно). На этом этапе апертурные области *A. manshuriensis* выявляются в наружных слоях спородермы, в эктэкине и наружных ламеллах эндэкины, но внутренние области эндэкины совершенно одинаковы по всему периметру микроспоры.

Появление интины под эндэкиной, связанное с небольшими инвагинациями плазмалеммы, у обоих видов проходит однотипно и с одинаковой интенсивностью (19 и 18% соответственно). У обоих видов при этом не удалось заметить первого митоза, который часто сопровождает инициацию интины. Формирование интины продолжается выпячиванием плазмалеммы в виде трубчатых структур, и здесь *A. manshuriensis* начинает «отставать» от *A. clematitidis* (19 и 24% соответственно). Стадия, когда трубчатая интина сравнима или толще экзины, также характеризуется меньшей длительностью у *A. manshuriensis* в сравнении с *A. clematitidis* (12 и 22% соответственно). Затем происходит расслоение интины на наружную трубчатую и внутреннюю светлую, гомогенную части. В случае *A. manshuriensis* эта стадия встречается у 9% всех изученных цветков, а в случае *A. clematitidis* – у 14%.

Зрелая спородерма характеризуется столбиковой эктэкиной с прерывистым покровом и тонким подстилающим слоем, тонкой, гомогенной электронно-плотной эндэкиной и двухслойной интиной. Такая ультраструктура спородермы выявлена только у *A. clematitidis* и была отмечена у 2% цветков. В таких цветках пыльцевые зерна уже имели пыльцевые трубки, что было заметно при первичном осмотре гиностегиев с помощью лупы. Для *A. manshuriensis* спородерма с тонкой гомогенной эндэкиной и неравномерно утолщенной интиной, выпирающей из интактной экзины, не обнаружена ни у культивируемых растений в ботаническом саду МГУ в Москве и ботаническом саду во Владивостоке, ни у близкого вида *A. macrophylla* Lam., также культивируемого в ботаническом саду в Москве, ни на гербарных экземплярах *A. manshuriensis* и *A. macrophylla* (несмотря на наличие у обоих видов пыльцевых зерен с пыльцевыми трубками, хорошо заметными в лупу). Изучение таких проросших пыльцевых зерен на срезах ТЭМ показало, что все пыльцевые трубки, одетые интактной, двухслойной интиной, выходили через трещины в экзине. Экзина при этом была на стадии шести–восьми слоев чередующихся ламелл и гранул эндэкины. Растения из ботанического сада МГУ регулярно завязывают много плодов, однако семена в них невсхожие. Возможно, это происходит по причине мужской стерильности, связанной с недоразвитием мужского гаметофита, которая маркируется не прошедшим до конца формированием эндэкины, и/или проблемами с перекрестным опылением и невозможностью самоопыления. Однако в последнем случае незрелость эндэкины остается необъясненной.

Анализ длительности последовательных фаз развития спородермы как функции доли бутонов на данной стадии от общего числа проанализированных бутонов (рис. 2), показывает, что первая стадия (мейоз и молодые микроспоры с ровной плазмалеммой) длится дольше, чем последующие стадии построения примэкины, вплоть до формирования первой ламеллы с белой линией. После растворения каллозы самым длительным становится процесс формирования интины. Это хорошо согласуется с относительной толщиной слоев спородермы. Именно интина является самым толстым слоем в оболочке. Все тетрадные стадии и первые стадии посттетрадного периода у *A. clematitidis* протекают заметно быстрее, чем у *A. manshuriensis* несмотря на то, что для *A. clematitidis* характерен сукцессивный микро-

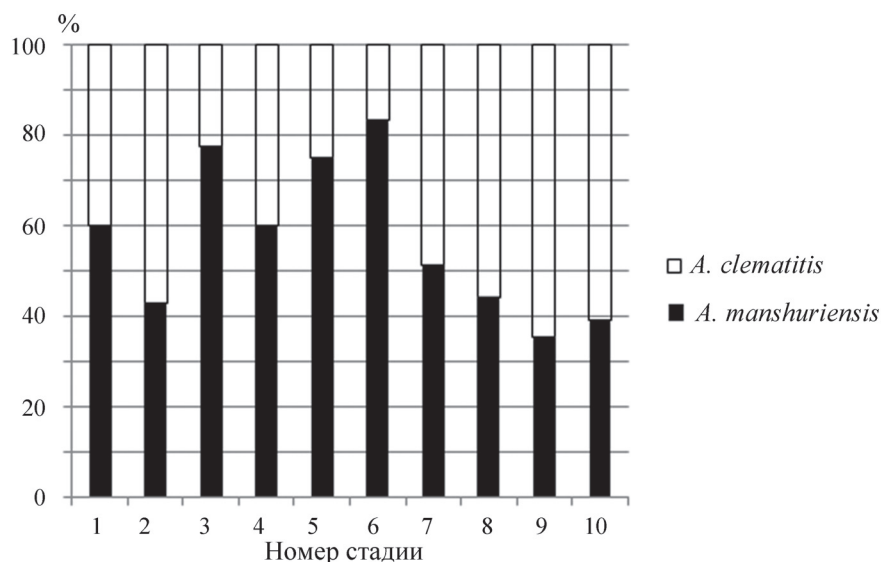


Рис. 2. Гистограмма распределения относительной длительности стадий развития спородермы двух видов кирказона (процент количества бутонов на данной стадии от общего числа бутонов) Стадии развития спородермы. Тетрадный период: 1 – мейоз и ровная плазмалемма молодых микроспор; 2 – плазмалемма вскипает, появляются гранулы примэкзины; 3 – выявляются протостолбики и протопокрыв; 4 – появляется первая ламелла эндэкзины. Посттетрадный период: 5 – мало ламелл эндэкзины; 6 – много ламелл и гранул эндэкзины; 7 – плазмалемма вскипает, инициация интины; 8 – мало интины; 9 – много интины; 10 – расслоение интины

спорогенез, который логичнее было бы считать более длительным процессом, чем симультанный, характерный для *A. manshuriensis*. Для *A. manshuriensis* характерно замирание процесса формирования примэкзины сразу после мейоза на стадии ровной плазмалеммы. Вплоть до инициации интины уже в посттетрадном периоде процессы построения спородермы у *A. manshuriensis* происходят медленнее, чем у *A. clematitis* за исключением формирования интины. Интина развивается у *A. clematitis* значительно медленнее, чем у *A. manshuriensis*, но зато доходит до кон-

ца (до формирования апертуры). Таким образом, замедление формирования спородермы на последних этапах позволяет пыльцевым зернам *A. clematitis* сформировать апертуру, которая изначально не закладывалась. У более «медлительных», вплоть до инициации интины, пыльцевых зерен *A. manshuriensis* не хватает времени сформировать какие-либо апертуры. От них остаются только следы в виде глубоких щелей в эктэкзине, при этом эндэкзина и интина остаются однотипными и толстыми по всему периметру пыльцевого зерна.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029 («Растения»)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[REFERENCES]

- Миронов А.А., Комисарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб., 1994. 400 с. [Mironov A.A., Komisarchik Ya.Yu., Mironov V.A. Metody elektronnoi mikroskopii v biologii i meditsine. SPb. Nauka. 1994. 400 s.]
- Полевова С.В. Пыльца двух видов кирказона: сходство и отличия на разных стадиях развития // «Палеоботаника и эволюция растений», Конференция, посвященная 80-летию со дня рождения Сергея Викторовича Мейена (1935–1987) Москва, Главный ботанический сад РАН, 15–16 декабря 2015 г. [Polevova S.V. Pyl'tsa dvukh vidov kirkazona: skhodstvo i otlichiya na raznykh stadiyakh razvitiya // «Paleobotanika i evolyutsiya rastenii», Konferentsiya, posvyashchennaya 80-letiyu so dnya rozhdeniya Sergeya Viktorovicha Meiena (1935–1987) Moskva, Glavnyi botanicheskiy sad RAN, 15–16 dekabrya 2015 g.]
- Bennett M.D., Lewis K.R., Harberd D.J. The time and duration of meiosis // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1977. Vol. 277. N 955. P. 201–226.
- Erdtman G. Pollen morphology and plant taxonomy-angiosperms. Stockholm. 1952.
- Hesse M., Halbritter H., Zetter R., Weber M., Buchner R., Frosch-Radivo A., Ulrich S. Pollen Terminology. An Illustrated Handbook. Wien, 2009. 261 p.
- Gonzalez F., Rudall P.J., Furness C.A. Microsporogenesis and systematic of Aristolochiaceae // Bot. J. Linn. Soc. 2001. Vol. 137. P. 221–242.

- Halbritter H., Weber M., Buchner R., Schneider H. *Aristolochia arborea* / PalDat (2016-11-03) – a palynological database. Published on the Internet https://www.paldat.org/pub/Aristolochia_arborea/301871 [accessed 2017-02-11].
- Nakonechnaya O.V., Sidorenko V.S., Koren' O.G., Nesterova S.V., Zhuravlev Yu.N. Specific features of pollination in the Manchurian birthwort, *Aristolochia manshuriensis* // Biology Bulletin. 2008. Vol. 35. N 5. P. 459–465.
- Neinhuis C., Wanke S., Hilu K.W., Muller K., Borsch T. 2005. Phylogeny of Aristolochiaceae based on parsimony, likelihood, and Bayesian analyses of trnL–trnF sequences // Int. J. Plant Syst. Evol. Vol. 250. P. 7–26.
- Ohi-Toma T., Sugawara T., Murata H., Wanke S., Neinhuis C., Murata J. Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of rbcL, matK, and phyA genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers // Systematic Botany. 2006. Vol. 31. N 3. P. 481–492.
- Polevova S.V. Ultrastructure and development of sporoderm in *Aristolochia clematitis* (Aristolochiaceae) // Review of Palaeobotany and Palynology. 2015. Vol. 222. P. 104–115.
- Stevens P.F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since].” <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Поступила в редакцию / Received 22.12.2016
Принята к публикации / Accepted 18.06.2017

COMPARISON OF THE TIMING OF SPORODERM DEVELOPMENT IN *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* AND *ARISTOLOCHIA MANSHURIENSIS*

S.V. Polevova¹

Two *Aristolochia* species are distinguished by microsporogenesis types and time of aperture initiation in the sporoderm development. *A. clematitis* has successive meiosis and forms an aperture in the late free microspore stage when the intine is maturing. *A. manshuriensis* has simultaneous microsporogenesis and forms aperture regions in the middle tetrad stage. However, the endexine and intine develop uniformly all over the pollen grain without any differences indicating aperture regions. Strong slowing of intine development at the end of pollen ontogeny allows pollen of *A. clematitis* to have an aperture which had not been formed at first. Pollen grains of *A. manshuriensis*, which are tardy up to the stage of intine initiation, do not have enough time to form any aperture in last stages of endexine and intine development. Only deep cracks in the ectexine weakly remind of apertures in *A. manshuriensis*.

Key words: *Aristolochia clematitis*, *Aristolochia manshuriensis*, pollen grains, sporoderm development, timeline sporoderm development.

Acknowledgement. The study was performed with financial support of Russian Science Foundation, project 14-50-00029 «Scientific basis of the national biobank – depository of the living systems» (branch «Plants»).

¹ Polevova Svetlana V., Morphology and Taxonomy of Higher Plant Department of Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University; svetlanapolevova@mail.ru.