

Особенности развития мужской репродуктивной сферы *Juniperus foetidissima* Willd. в Горном Крыму

Features of the development of the male reproductive sphere of *Juniperus foetidissima* Willd. in the Mountainous Crimea

Коренькова О. О.

Korenkova O. O.

Национальный исследовательский Московский государственный строительный университет, г. Москва, Россия

E-mail: o.o.korenkova@mail.ru

Moscow State University Of Civil Engineering (National Research University), Moscow, Russia

Реферат. *Juniperus foetidissima* Willd. – наиболее редкий вид можжевельника в Крыму, занесенный в Красные книги Крыма и Российской Федерации. Несмотря на произрастание основной части популяции на особо охраняемой природной территории, подрост вида полностью отсутствует. В этой связи оценка качества пыльцы, как ключевого этапа репродуктивного процесса, приобретает особое значение для понимания причин деградации популяции. Целью работы являлось определение морфометрических особенностей пыльцевых зерен *J. foetidissima*, оценка их фертильности и реальной жизнеспособности. Выявлено расхождение между высокой долей фертильной пыльцы ($79,51 \pm 2,62$ %) и ее фактической неспособностью к прорастанию. Установлено, что длина пыльцевых трубок ($16,8 \pm 1,27$ мкм) в 1,7 раза меньше диаметра самих зерен, что не соответствует даже минимальным критериям прорастания. Проведен сравнительный анализ свежесобранной пыльцы и пыльцы из восьмилетних гербарных образцов, показавший, что сухая пыльца сохраняет способность к гидратации и сбрасыванию экзины (68–73 % случаев), однако также не формирует полноценных пыльцевых трубок. Морфометрический анализ продемонстрировал, что средний диаметр пыльцевых зерен ($27,71 \pm 1,19$ мкм) является низковариабельным, генетически закрепленным признаком и не может использоваться для систематической диагностики. Полученные данные объясняют отсутствие подроста при внешне благополучном состоянии взрослых деревьев и обосновывают необходимость разработки мер по сохранению вида, включая оценку возможностей его семенного размножения в искусственных условиях.

Ключевые слова. Жизнеспособность пыльцы, Крым, прорастание пыльцы, пыльцевые зерна, пыльцевая трубка, фертильность пыльцевых зерен, *Juniperus foetidissima*.

Summary. *Juniperus foetidissima* Willd. is the rarest juniper species in Crimea, listed in the Red Data Books of Crimea and the Russian Federation. Despite the main part of its population growing in a specially protected natural area, the species' regeneration is completely absent. In this regard, assessing pollen quality, as a key stage of the reproductive process, is particularly important for understanding the causes of population degradation. The aim of this work was to determine the morphometric features of *J. foetidissima* pollen grains and to assess their fertility and actual viability. A discrepancy was revealed between a high proportion of fertile pollen (79.51 ± 2.62 %) and its actual inability to germinate. The length of the pollen tubes (16.83 ± 1.27 μm) was found to be 1.7 times less than the diameter of the grains themselves, which does not meet even the minimum germination criteria. A comparative analysis of freshly collected pollen and pollen from eight-year-old herbarium specimens was conducted, showing that dry pollen retains the ability to hydrate and shed the exine (68–73 % of cases), but also does not form full-fledged pollen tubes. Morphometric analysis demonstrated that the average pollen grain diameter (27.71 ± 1.19 μm) is a low-variability, genetically fixed trait and cannot be used for taxonomic diagnosis. The obtained data explain the lack of regeneration despite the seemingly favorable condition of mature trees and substantiate the need to develop species conservation measures, including assessing the possibilities of its seed reproduction under artificial conditions.

Key words. Crimea, *Juniperus foetidissima*, pollen fertility, pollen germination, pollen grains, pollen tube, pollen viability.

Введение. На территории Крымского полуострова в настоящее время встречается пять видов можжевельника: *Juniperus communis* L., *Juniperus deltoides* R. P. Adams, *Juniperus excelsa* M.-Bieb., *Juniperus foetidissima* Willd. и *Juniperus sabina* L. Все они занесены в Красную книгу Крыма, при этом *J. excelsa* и

J. foetidissima также охраняются на федеральном уровне и включены в Красную книгу Российской Федерации (Камелин, 2008; Фатерыга, 2015).

Среди всех крымских видов можжевельника наиболее редким является *J. foetidissima*, площадь насаждений которого составляет всего 51,6 га (Коренькова, 2014). Основная часть его популяции в Крыму сосредоточена на территории природного заповедника «Крымский», что обеспечивает надежную защиту от негативного антропогенного воздействия как в прошлом, так и в настоящем.

Ключевым этапом репродуктивного процесса является формирование мужской репродуктивной сферы. Показатели количества и качества пыльцы служат интегральной характеристикой успешности семеношения и, следовательно, стабильности естественного восстановления лесных массивов. Эти вопросы особенно актуальны для редких и исчезающих видов, к которым относится в *J. foetidissima* (Vergotti et al., 2019; López-Orozco, et al., 2021; Dias et al., 2022).

Биометрические параметры пыльцы имеют большое значение для систематики и изучения филогении растений. Применение методов количественной морфогенетики позволяет раскрыть закономерности и механизмы адаптации организма и его структур в ходе индивидуального развития.

При этом, жизнеспособность и энергия роста пыльцы выступают главными критериями эффективности развития мужских репродуктивных органов. Качество пыльцевых зерен проявляется в их способности образовывать пыльцевые трубки, а длина этих трубок позволяет судить об энергии роста. Снижение качества пыльцы и появление тератологических форм пыльцевых трубок могут свидетельствовать о нарушениях в процессе мейоза микроспороцитов, что, в свою очередь, ведет к пусто-семянности или формированию недоразвитых зародышей (Сурсо, 2018; Сурсо, Чухчин, 2020; Сурсо, 2022).

Целью исследования явилось определение принципов развития мужской репродуктивной сферы *J. foetidissima*, произрастающего в Горном Крыму. Исходя из цели работы были поставлены следующие задачи: установить морфометрические особенности пыльцевых зерен *J. foetidissima*; определить уровень их фертильности и жизнеспособности.

Материал и методика. Объектом исследования выступила популяция *J. foetidissima*, произрастающая на склонах хребта Синаб-Даг (Горный Крым). Сбор пыльцевых зерен осуществляли в фазу массового пыления, путем встряхивания микростробиллов над стерильными бюксами. До начала лабораторного анализа образцы хранились в эксикаторе с хлористым кальцием при температуре +5 °C (Котелова, 1956).

Измерения диаметра пыльцевых зерен (в двух перпендикулярных плоскостях) проводились на временных ацетокарминовых препаратах с использованием цифрового микроскопа Bresser LCD Micro 5mp. Для оценки потенциальной фертильности применяли метод окрашивания ацетокармином по З. П. Паушевой (1988). Проращивание пыльцы осуществляли через 1–2 суток после сбора методом висячей капли на среде из 1% сахарозы при $t = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Паушева, 1988). Качество пыльцы оценивали на 7-й и 14-й дни эксперимента. Степень изменчивости признаков определяли по шкале С. А. Мамаева (1973), статистическую обработку данных выполняли общепринятыми методами (Лакин, 1990).

Результаты. Ареал произрастания *J. foetidissima* в Горном Крыму ограничен исключительно склонами хребта Синаб-Даг (Коренькова, 2014), что делает невозможным проведение сравнительного анализа изменчивости морфометрических показателей пыльцы в зависимости от меняющихся условий среды. Исследования показали, что средний диаметр пыльцевых зерен в крымской популяции данного вида составляет $27,71 \pm 1,19$ мкм, что соответствует средним значениям, характерным для рода можжевельник.

На основании проведенных исследований можно заключить, что параметры пыльцевых зерен характеризуются низким и очень низким уровнем изменчивости, являясь генетически закрепленным видовым признаком. В силу значительного сходства этого показателя у разных видов, диаметр пыльцы не может служить надежным критерием для определения их систематической принадлежности.

В период исследований у *J. foetidissima* отмечается высокая доля фертильной пыльцы $-79,51 \pm 2,62\%$, что почти в 1,3 раза больше, чем было установлено для него в 2012 г. Т. И. Колодяженской (Колодяженська и др., 2012). При этом, ситуация с естественным возобновлением вида в Крыму является самой критичной, подрост отсутствует вовсе. На основании чего возникает необходимость выявления реальной жизнеспособности пыльцы и определения причин, приведших к крайне низкой численности особей подроста исследуемых видов.

Особого внимания заслуживает способность пыльцевых зерен сохранять свои качества с течением времени. Из литературных источников известно, что жизнеспособность пыльцы поддерживается на протяжении 3 месяцев (Склонная, Ругузов, 1982). Для сопоставления качественных характеристик пыльцевых зерен использовали свежесобранную пыльцу и пыльцу, полученную из мегастробил гербарных образцов, хранившихся в течение 8 лет при комнатной температуре, модельные деревья произрастали на одной и той же пробной площади.

Сухие пыльцевые зерна *J. foetidissima* прокрашиваются интенсивно и степень их прокраски практически не отличается от свежесобранной (рис. 1а, рис. 1б). Доля фертильной пыльцы с гербарных образцов составляет $71,46 \pm 3,16 \%$, что близко к показателю свежесобранной. Учитывая значительную интенсивность окраски, можно предположить, что отличия в числе прокрашенных пыльцевых зерен двух видов скорее обусловлено климатической разницей исследуемых годов, нежели продолжительностью хранения самой пыльцы.

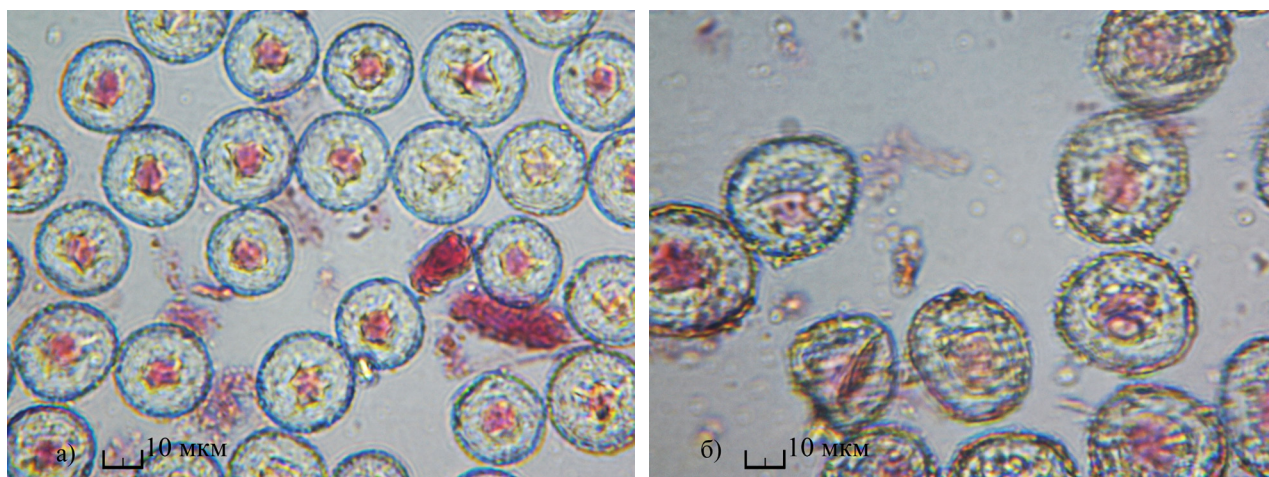


Рис. 1. Внешний вид прокрашенной пыльцы *J. foetidissima*.

а) – свежесобранная пыльца; б) – сухая пыльца.

В научной литературе отсутствует единый критерий для определения факта прорастания пыльцы. Распространенной точкой зрения является мнение, согласно которому пыльцевое зерно считается проросшим при достижении длины пыльцевой трубки величины, равной или превышающей его диаметр. Однако, согласно методике М. В. Сурсо (2012), о прорастании правомерно судить лишь тогда, когда трубка достигает длины в 3–4 диаметра зерна. Автор обосновывает это тем, что именно такой показатель служит достоверным индикатором жизнеспособности пыльцы. В своей работе М. В. Сурсо (2012) выделяет ряд последовательных стадий прорастания у можжевельников, на основании чего и рассчитывает средние показатели жизнеспособности.

При помещении пыльцы в водную среду или на питательный субстрат запускается процесс гидратации, в ходе которого происходит сбрасывание экзины и формирование гидрофильной капсулы. Внутри этой капсулы, размер которой в среднем в 1,5 раза превышает диаметр исходного пыльцевого зерна, и происходит развитие микрогаметофита. Согласно литературным данным, рост пыльцевой трубки инициируется непосредственно в гидрофильной капсуле, которая сохраняется на протяжении всего периода её развития (Сурсо, 2012).

В ходе проведенных исследований установлено, что пыльцевые зерна *J. foetidissima* прорастают исключительно в дистиллированной воде. Длина пыльцевой трубки *J. foetidissima* составляет $16,83 \pm 1,27$ мкм, что меньше диаметра пыльцевого зерна в 1,7 раза. На основании чего пыльцу особей *J. foetidissima*, произрастающих в Горном Крыму нельзя назвать жизнеспособной. Подобное явление может быть связано с крайне низкой толерантностью вида к загрязнению окружающей среды. Что, в свою очередь, является одной из причин полного отсутствия подраста и сокращения ареала данного вида в Крыму.

Отдельно необходимо обратить внимание на проращивание пыльцевых зерен гербарных образцов. В ходе проведенных исследований, установлено, что 68–73 % сухой пыльцы (насчитывающей

8 лет хранения в качестве гербарного образца) при попадании на питательную среду или воду сбрасывают экзину и образуют гидрофильную капсулу. Что согласно М. В. Сурсо (Сурсо, Чухчин, 2020) является первой категорией прорастания пыльцевых зерен (рис. 2).

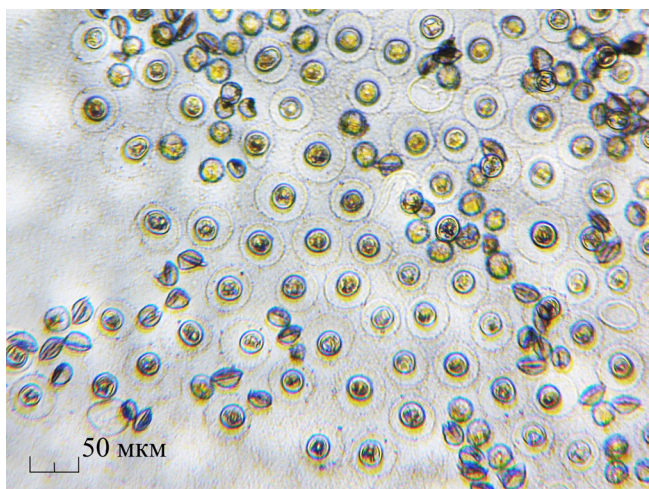


Рис. 2. Сухая пыльца *J. foetidissima* на этапе прорастивания.

уровнем изменчивости. Это исключает возможность использования данного показателя для систематической диагностики, но характеризует видовую норму.

Выявлено расхождение между высокой долей фертильной пыльцы ($79,51 \pm 2,62 \%$), и её реальной неспособностью к прорастанию. Несмотря на то, что свежесобранная пыльца демонстрирует высокую степень окрашиваемости (как и пыльца восьмилетней давности из гербарных образцов), в экспериментах по проращиванию она не образовывала пыльцевых трубок, достаточных для признания ее жизнеспособной. Длина трубки ($16,83 \pm 1,27$ мкм) оказалась в 1,7 раза меньше диаметра самого зерна, что не соответствует даже минимальным критериям прорастания.

Зафиксированная картина позволяет предположить, что пыльца *J. foetidissima* в крымской популяции является физиологически неполноценной. Наиболее вероятной причиной этого является крайне низкая толерантность вида к антропогенному загрязнению среды, что приводит к нарушениям в микроспорогенезе, не выявляемым при стандартной цитохимической окраске. Разрушение питательных веществ в пыльцевых зернах, вероятно, лишает ядро пыльцевой трубки энергии, необходимой для роста.

Данный вывод напрямую коррелирует с наихудшей в Крыму ситуацией по естественному обновлению вида: полное отсутствие подраста при наличии фертильной (по данным окрашивания) пыльцы свидетельствует о блокировке репродуктивных процессов на этапе оплодотворения. В связи с этим, для сохранения популяции *J. foetidissima* необходим не только мониторинг состояния взрослых деревьев, но и поиск причин, вызывающих деградацию мужской репродуктивной сферы, а также оценка возможности семенного размножения в условиях *ex situ*.

ЛИТЕРАТУРА

Камелин Р. В. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с.

Колодяженська Т. І., Похильченко О. П., Клименко Ю. О. Проблеми збереження *ex situ* та *in situ* ялівця смердючого (*Juniperus foetidissima* Willd.) в Україні // Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин: матер. міжнар. наук. конф. – Київ: ПАЛІВОДА А.В., 2012 – С. 255–256.

Коренькова О. О. Исследование особенностей территориального распределения древостоев *Juniperus foetidissima* Willd. в урочище Синаб-Дар // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия, 2014. – Т. 27(66), № 2. – С. 96–102.

- Котелова Н. В.** Проращивание пыльцы на искусственных средах и способы хранения пыльцы сосны обыкновенной // Научно-техническая информация МЛТИ, 1956. – № 23. – С. 13–20.
- Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
- Мамаев С. А.** Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. – М.: Наука, 1973. – 284 с.
- Паушева З. П.** Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
- Склонная Л. У, Ругузов И. А.** Методические рекомендации по элитному семеноводству тиса ягодного и можжевельника высокого. – Ялта: ГНБС, 1982. – 13 с.
- Сурсо М. В.** Микроспорогенез, опыление и микрогаметогенез у *Juniperus communis* (Cupressaceae) // Ботанический журнал, 2012. – Т. 97, № 2. – С. 211–221.
- Сурсо М. В.** Адаптация мужской репродуктивной сферы можжевельника обыкновенного к климату // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал, 2018. – № 6(366). – С. 57–69. <https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2018.6.57>
- Сурсо М. В., Чухчин Д. Г.** Рост и развитие пыльцевой трубки можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis*): роль ядра клетки трубки // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал, 2020. – № 2(374). – С. 20–34. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-2-20-34>
- Сурсо М. В.** Оценка доброкачественности пыльцы хвойных видов методом окрашивания пыльцевых зерен флуоресцеин диацетатом // Journal of Agriculture and Environment, 2022. – № 5(25). – С. 1–6. <https://doi.org/10.23649/jae.2022.5.25.05>
- Фатерыга В. В.** Можжевельник высокий // Красная книга Республики Крым. Растения, водоросли и грибы. – Симферополь: ООО «ИТ «АРИАЛ», 2015. – С. 64.
- Dias M. C., Oliveira J. M. P. F., Marum L., Pereira V., Almeida T., Nunes S., Araújo M., Moutinho-Pereira J., Correia C. M., Santos C.** *Pinus elliottii* and *P. elliottii* x *P. caribaea* hybrid differently cope with combined drought and heat episodes // Industrial Crops and Products, 2022. – Vol. 176. – P. 114428. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114428>
- López-Orozco R., García-Mozo H., Oteros J., Galán C.** Long-term trends in atmospheric *Quercus* pollen related to climate change in southern Spain: A 25-year perspective // Atmospheric Environment, 2021. – Vol. 262. – P. 118637. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2021.118637>
- Vergotti M. J., Fernández-Martínez M., Kefauver S. C., Janssens I. A., Penuelas J.** Weather and trade-offs between growth and reproduction regulate fruit production in European forests // Agricultural and Forest Meteorology, 2019. – Vol. 279. – P. 107711. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.107711>