

ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ БИОЛОГИИ *BRASSICA TAURICA* (TZVEL.) TZVEL. (BRASSICACEAE)

Т.Н. Кузьмина, С.В. Шевченко

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр НААН

Brassica taurica (Tzvel.) Tzvel. (*B. sylvestris* (L.) Mill. subsp. *taurica* Tzvel.) – капуста крымская – раритетный вид флоры Крыма (Цвелев, 1970; Никифоров, 2004;), внесенный в ряд списков растений, подлежащих охране (Вопросы развития Крыма, 1999; Каталог видов флоры..., 1999; Червона книга України, 2009). Вид имеет ограниченный ареал, приуроченный к восточным склонам горы Аю-Даг (Крым). В последние годы незначительная по численности ценопопуляция *B. taurica* отмечена в районе мыса Мартьян. Возобновление вида в естественной среде обитания возможно главным образом благодаря семенному размножению. В связи с этим, учитывая генетическую ценность вида и необходимость его сохранения, нами проведено изучение репродуктивной биологии *B. taurica* с целью выявления адаптивных возможностей репродуктивной системы вида.

Объекты и методы исследований

Наблюдения за ходом динамики цветения, образования генеративных побегов у *B. taurica* проводили в 2005-2008 гг. в районе мыса Мартьян, а также на ценопопуляциях данного вида в бухте Панаир и на мысе Монастырский (гора Аюдаг). Фенофазы развития генеративной сферы учитывали в соответствии с Методологическими указаниями по фенологическим наблюдениям (Методические указания..., 1977). Возрастную структуру ценопопуляций *B. taurica* и плотность популяций *S. graeca* определяли по методикам, предложенным А.А. Урановым (1977). Изучение морфологии цветков и их элементов осуществляли с помощью бинокулярной лупы МБС-9 на растениях, взятых в естественной среде обитания. При описании морфологических особенностей строения цветка, соцветия использовали терминологию по Ал.А. Федорову, З.Т. Артюшенко (1975), с привлечением «Методических рекомендаций к изучению антропоэкологических особенностей цветковых растений» (1986).

В ходе приготовления цитозембриологических препаратов бутоны, завязи и плоды фиксировали смесью Чемберлена (90:5:5) и Карнуа (6:3:1) (Паушева, 1970). Парафиновые срезы толщиной 8-10 мкм, наклеенные на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и алциановым синим по модифицированной методике (Жинкина, Воронова, 2000), а также метилгрюпиронином с подкраской алциановым синим (Шевченко, Чеботарь, 1992). Для анализа средних образцов пыльцы материал окрашивали ацетокармином или метиловым зеленым и пиронином, согласно методике, предложенной С.В. Шевченко с соавторами (1986). Жизнеспособность пыльцы определяли методом Д.А. Транковского во влажной камере (Паушева, 1970) при температуре +19°C. Процент жизнеспособной пыльцы устанавливали по количеству проросших пыльцевых зерен, у которых пыльцевые трубки в длину были не менее диаметра пыльцевого зерна. При морфометрическом анализе пыльцевых зерен использовали окуляр-микрометр и объект-микрометр с ценой деления 10 мкм (0,01мм). Анализ препа-

ратов проводили на микроскопе «Jenaval» фирмы Carl Zeiss. Фотографии сделаны цифровой фотокамерой Olympus SP-350.

Выборку семян для оценки их всхожести проводили согласно технике отбора среднего образца (Минин, 1949). Семена *B. taurica* хранили в бумажных пакетах в лабораторных условиях при комнатной температуре, ежегодно проверяя их всхожесть, проращивая в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой по 50 шт. в 3-кратной повторности. Всхожесть подсчитывали на 30 день проращивания как процентное отношение числа проростков к числу заложенных семян в каждой повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Номенклатура вида приведена в соответствии с «Vascular plant of Ukraine: a nomenclature checklist» (Mosyakin, Fedoronchuk, 1999).

Результаты и обсуждение

B. taurica является многолетним растением, вегетация которого продолжается в течение всех сезонов года. Наиболее активный вегетативный прирост отмечается в осенне-зимний период. Цветение наступает после периода яровизации. Так, закладка соцветий и формирование бутонов у *B. taurica* происходит во второй декаде февраля. Начало цветения совпадает с первыми числами апреля, в этот же период завязываются первые плоды. Массовое цветение *B. taurica* отмечается в апреле. Созревание плодов занимает период с апреля по июль, диссеминация по типу барохория продолжается с июля по октябрь–ноябрь (табл. 1).

Таблица 1. Фенофазы генеративного развития *Brassica taurica*

Фенофаза	Календарные сроки
начало бутонизации	II декада февраля – II декада марта
начало цветения	III декада марта
массовое цветение	II декада апреля – I декада мая
конец цветения	III декада мая
завязывание плодов	III декада марта
начало созревания плодов	I-II декада мая
конец созревания плодов	III декада мая
начало диссеминации	июль
конец диссеминации	октябрь

Репродуктивная система *B. taurica* образована за счет мультипликации соцветий и называется «сложной» или «двойной» кистью (Методические рекомендации, 1986). Цветки в соцветии распускаются акропетально (рис 1).

Полностью сформированный бутон *B. taurica* продолговатый, высотой 0,6-0,7 см, лепестки в бутоне скручены влево. Цветок *B. taurica* полный, гермафродитный, симметричный, актиноморфный, в диаметре около 2 см (рис. 2). Все части цветка свободные, их расположение пентациклическое, гетеромерное. Цветок имеет цветоножку длиной около 1 см. В соцветии цветоножки равны между собой, неопушенные, цельные, прямые, отклоненные или горизонтальные. Околоцветник гетерохламидный, образован чашечкой и венчиком. Чашечка состоит из четырех прямых чашелистиков длиной около 1 см, прижатых к венчику. На стадии бутона они зеленые, в раскрытом цветке – желтые, расположены раздельно и по окончании цветения опадают. Венчик цветка свободный, четырехчленный. Несросшиеся лепестки желтого цвета образуют узкую гладкую трубку, по длине равную отогнутой пластинке лепестка. Лепестки обратнойцевидные по форме, с гладкой поверхностью и цельным краем. Венчик *B. taurica* опадающий. Четырехсильный андроцей представлен шестью тычинками, расположенными в два круга: во внешнем круге – две латеральные, во внутреннем – четыре медиальные тычинки, которые попарно сближены. Пыльники верхушечные, прямостоячие, 4-гнездные, гнезда соединены связником, продолжающим тычиночную нить. По размерам и форме все пыльники однообразные – продолговатые, расширенные к основанию. Пыльники желтого цвета, высотой около 3 мм, покрыты простыми волосками, направленными вверх. В раскрытом цветке тычинка достигает 1 см за счет увеличения длины тычиночной нити. Тычиночная нить прямая, гладкая. Четырехгнездные пыльники вскрываются продольными щелями на вентральной стороне (интрорзно) в базипетальном направлении.



Рис. 1. Внешний вид *Brassica taurica* на стадии цветения (1) и плодоношения (2)

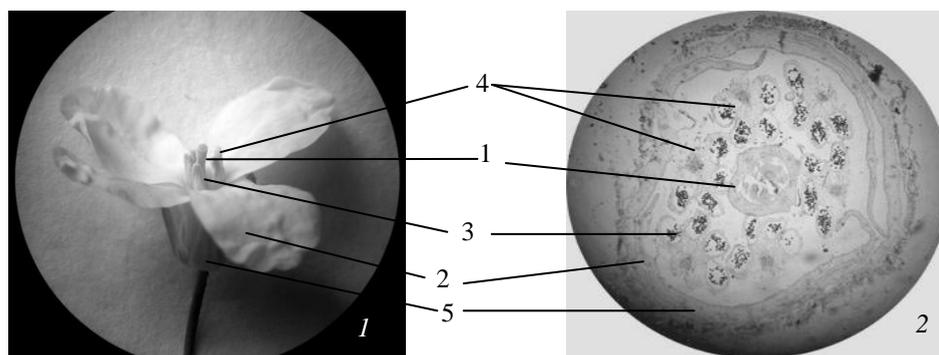


Рис. 2. Строение цветка *Brassica taurica*

1 – внешний вид; 2 – поперечный срез (увеличение $\times 30$); 1 – завязь, 2 – лепесток, 3 – латеральные тычинки, 4 – медиальные тычинки, 5 – чашелистик

Сформированная стенка микроспорангия состоит из эпидермиса, эндотеция, двух средних слоев и тапетума. Тапетум секреторного типа – однослойный или нерегулярно двухслойный – образован двуядерными клетками и является производным первичного париетального слоя. Его дезорганизация начинается в период мейотического деления микроспорцитов. В это же время происходит лизис средних слоев, при этом часть внутреннего среднего слоя со стороны связника не дегенерирует и в период дифференцирующего митоза микроспор в ней, как и в эндотеции, образуются фиброзные утолщения. На эпидерме формируются простые волоски и откладывается кутикула. Таким образом, внешняя стенка зрелого пыльника представлена двумя слоями: покрытым кутикулой эпидермисом с простыми волосками и эндотецием с фиброзными утолщениями. Средний слой, прилегающий к эндотецию, также имеет фиброзные утолщения (рис. 3).

Микроспороциты – крупные многогранные клетки с хорошо выраженным ядром – образуют 5-6 рядов. Микроспорогенез у *B. taurica* протекает по симультанному типу с образованием тетрад, в которых микроспоры расположены тетраэдрически или изобилатерально (рис. 3). Отмечена асинхронность микроспорогенеза в медиальных и латеральных тычинках. Зрелые пыльцевые зерна трехклеточные, с сетчатой поверхностью спородермы, меридиально трехборздные, но встречаются и одно-, двух-, и четырехборздные пыльцевые зерна. Пыльца *B. taurica* желтого цвета, сфероидальной или эллипсоидальной формы. Пыльцевые зерна медиальных и латеральных тычинок сходны по размерам. Их полярный диаметр составляет около 32 μ , а экваториальный – приблизительно 26 μ . Доли морфологически нормальных пыльцевых зерен в медиальных и латеральных тычинках, в целом, равны (87,83 и 89,46%, соответственно), а доля дефективной пыльцы, размером около 19 μ , составила 12,17 и 10,54%, соответственно для медиальных и латеральных тычинок (табл. 2).

Основной причиной образования стерильных пыльцевых зерен являются нарушения в ходе мейоза: неравномерное расхождение хромосом, выброс хромосом за пределы ахроматинового веретена и образование микроядер, как в процессе редукционного (I) деления, так и при эквационном (II) делении (рис. 4).

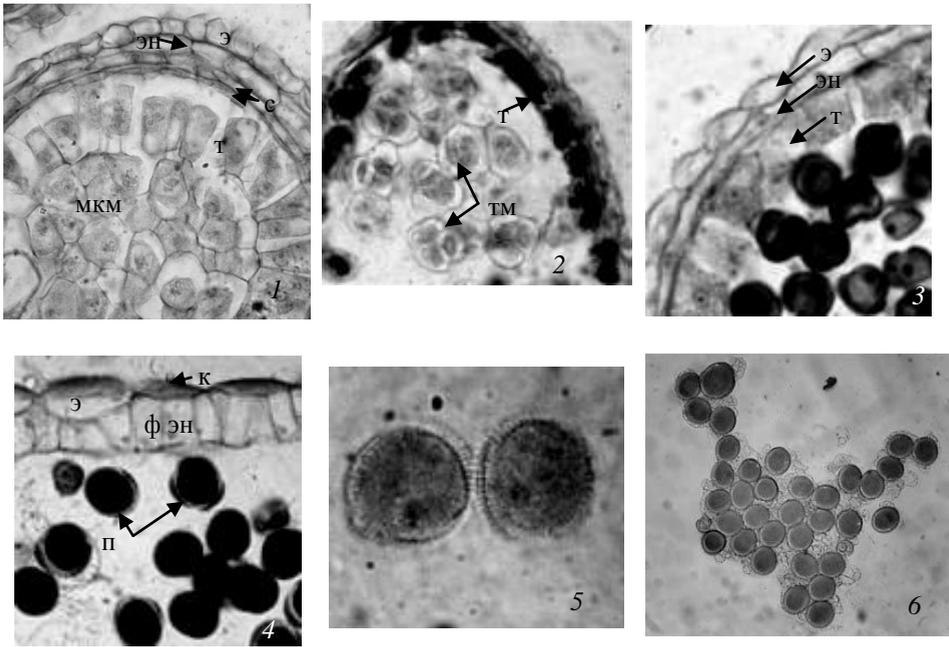


Рис. 3. Основные этапы развития стенки микроспорангия и пыльцевых зерен у *Brassica taurica*

1 – фрагмент сформированного микроспорангия; 2 – микроспорангий на стадии сформированных тетрад микроспор; 3 – фрагмент стенки микроспорангия на стадии дифференцирующего деления микроспор; 4 – стенка зрелого пыльника и пыльцевые зерна; 5 – трехклеточные пыльцевые зерна; 6 – пыльцевые зерна, покрытые трифиной (к – кутикула; мкм – микроспороциты; пз – пыльцевые зерна; сс – средний слой; т – тапетум; тм – тетрада микроспор; ф эн – фиброзный эндотеций; э – эпидермис; эн – эндотеций)

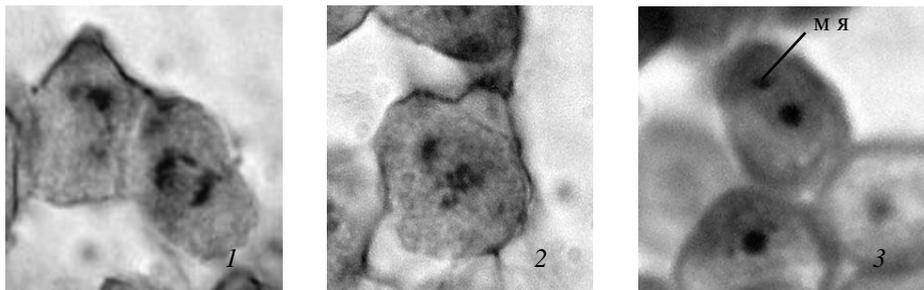


Рис. 4. Аномалии мейоза в микроспороцитах у *Brassica taurica*

1 – неравномерное расхождение хромосом; 2 – выброс хромосом за пределы веретена деления; 3 – образование микроядер (м я)

Таблица 2. Морфометрические параметры пыльцевых зерен медиальных и латеральных тычинок у *Brassica taurica*

Тип тычинок	Морфометрические параметры	Размах варьирования, min – max, μ	Среднее арифметическое, $M \pm m$, μ	Среднее квадратичное отклонение, σ	Коэф. вариации V, %
Медиальные	Морфологически нормальные пыльцевые зерна				
	полярный диаметр	30-42	32,13 \pm 0,30	2,35	0,07
	экваториальный диаметр	22-38	26,97 \pm 0,27	2,78	0,10
	Дефективные пыльцевые зерна				
	полярный диаметр	16-22	18,84 \pm 0,29	1,61	0,09
Латеральные	Морфологически нормальные пыльцевые зерна				
	полярный диаметр	24-42	31,70 \pm 0,34	2,77	0,88
	экваториальный диаметр	20-36	25,70 \pm 0,35	2,89	0,11
	Дефективные пыльцевые зерна				
	полярный диаметр	16-22	18,97 \pm 0,31	1,70	0,09

Пыльца у *B. taurica* покрыта особым веществом – трифиной, которая, как известно, представляет собой гетерогенную смесь веществ с большим содержанием липидов и гликолипидов и цитоплазматических остатков, является типичным покрытием пыльцевых зерен представителей сем. Brassicaceae и обуславливает проявление спорофитной самонесовместимости (Вишнякова, 1997).

В лабораторных условиях пыльца *B. taurica* сохраняет способность к образованию пыльцевых трубок в течение 5-7 суток, при этом в ходе цветения отмечена тенденция снижения ее жизнеспособности.

Гинецей у *B. taurica* ложнодвугнездный, паракарпный, образован двумя плодолистиками с париетальной плацентацией семязачатков, которых, в среднем, в завязи насчитывается 25. В каждом плодолистике семязачатки располагаются двумя рядами. Завязь у *B. taurica* верхняя, продолговатая с гладкой поверхностью и с четко выраженными продольными боковыми швами. Стилodium терминальный, прямостоячий, не превышает длины завязи. Рыльце верхушечное, округлое, маленькое, желтого цвета, с небольшими сосочками (рис. 2).

Семязачаток *B. taurica* битегмальный. Внутренний интегумент эпидермального происхождения. Наружный – дермально-субэпидермального. Семязачаток медионуцеллятный, на ранних стадиях ана-кампилотропный, в зрелом состоянии – ана-амфитропный. Археспориальная клетка преобразуется в мегаспороцит, иногда закладывается две археспориальные клетки, каждая из которых формируется в мегаспороцит. Мегаспорогенез происходит с образованием линейной тетрады мегаспор. Как правило, халазальная мегаспора дает начало зародышевому мешку, который развива-

ется по Polygonum-типу (рис. 5). Отмечены случаи развития зародышевого мешка из эпихалазальной мегаспоры.

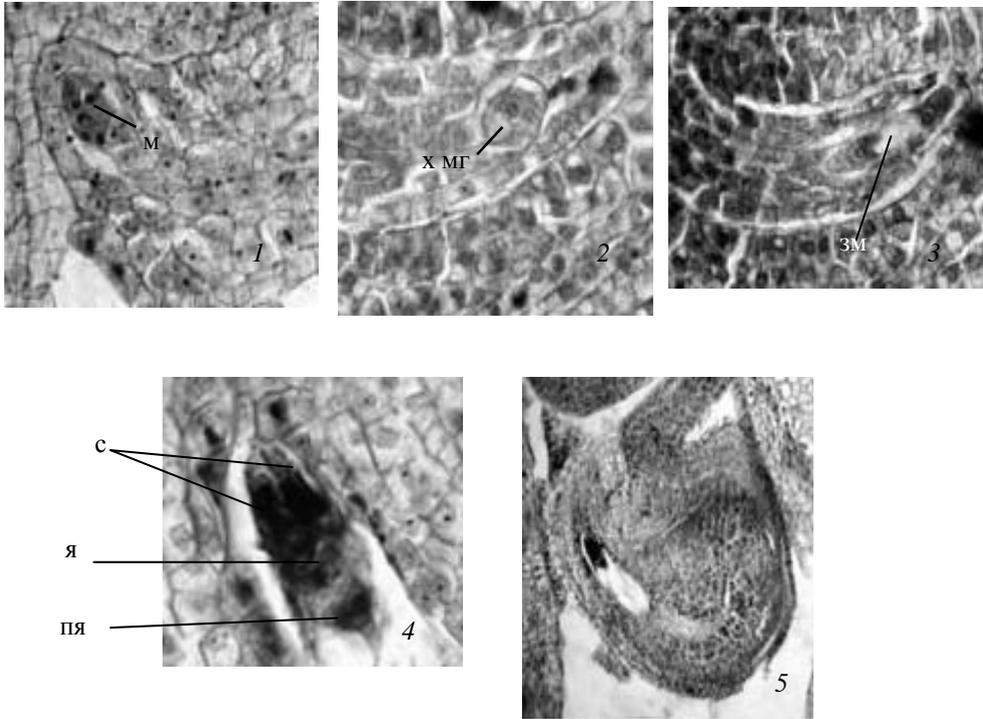


Рис. 5. Развитие семязачатка и зародышевого мешка у *Brassica taurica*

1 – семязачаток на стадии мегаспороцита (м), начало образование интегументов; 2 – развитие халазальной мегаспоры (х мг), апоптоз мегаспор; 3 – четырехядерный зародышевый мешок (зм); 4 – фрагмент зародышевого мешка с яйцеклеткой (я), синергидами (с) и полярными ядрами (пя); 5 – ана-амфитропный семязачаток со зрелым зародышевым мешком

Следует отметить, что, несмотря на асинхронность развития мужской и женской генеративных сфер цветка *B. taurica* на начальных этапах, к моменту открытия околоцветника мужской и женский гаметофиты полностью сформированы и потенциально готовы к оплодотворению.

Наблюдение за суточным ритмом цветения показало, что раскрываться околоцветник начинает в вечерние часы. В целом, генеративные элементы цветка *B. taurica* сохраняют жизнеспособность в течение 5-7 суток. Особенности пространственного расположения тычинок и завязи и зрелость гаметофитов к началу цветения позволяют предположить в числе возможных типов опыления автогению. Однако опыты по определению системы скрещивания показали, что образование плодов у *B. taurica* возможно только при свободном опылении. Количество завязей, в которых формируются семена, в данном случае достигает около 80%. При изоляции сформированных бутонов на стадии, предшествующей началу открытия околоцветника, а также изоляции завязей рыхлых бутонов, цветки и бутоны дегенерируют и опадают в

течение недели, что свидетельствует о проявлении самонесовместимости и аллогении как основном типе скрещивания у *B. taurica*, которая реализуется благодаря энтомофилии.

Оплодотворение у *B. taurica* происходит по премитотическому типу. Формирование нуклеарного эндосперма предшествует делению зиготы, однако в зрелом семени эндосперм отсутствует. Развитие зародыша протекает по *Onagrad*-типу. Зрелое семя *B. taurica* содержит дифференцированный зародыш спинокорешкового типа, покрытый семенной кожурой эндотестально-эндотегмального типа.

Семена *B. taurica* не имеют периода покоя и способны прорасти сразу после диссеминации. Образование проростка начинается с проклевывания корешка, которое происходит через сутки с момента помещения семян на увлажненную фильтровальную бумагу. Семядоли прорастают на 3-4 сутки.

В лабораторных условиях всхожесть семян *B. taurica* непосредственно в год их генерации составляет $83,56 \pm 6,46\%$, и незначительно отличается от данных, полученных при проращивании семян в земельной смеси ($96,00 \pm 4,00\%$). При хранении семян отмечается колебание всхожести с общей тенденцией значительного снижения. Так, всхожесть семян на 4 год хранения составила $4,67 \pm 1,33\%$. При проращении семян *B. taurica* часть проростков имеет морфологические аномалии, соответствующие категориям аномальных проростков для видов и культурных форм семейства *Brassicaceae* (Веллингтон, 1973). При анализе соотношения количества морфологически нормальных и аномальных проростков отмечается увеличение доли проростков с различного рода морфологическими нарушениями (недоразвитие первичного корня, деформированные гипокотиль и семядоли, а также их некроз) при увеличении срока хранения. Так, если доля аномальных проростков после одного года сухого хранения семян года равна $3,97\%$, то на четвертый год хранения аномальные проростки составили $96,87\%$ от общего числа всходов данного варианта (рис. 6), что свидетельствует о снижении морфогенетических корреляций в организации зародыша и дисбалансе регулирующих систем и позволяет рассматривать четырехлетний период как предельный срок сухого хранения семян *B. taurica* в лабораторных условиях.



Рис. 6. Соотношение нормальных и аномальных проростков, образовавшихся из семян *Brassica taurica* различного срока сухого хранения

Следует отметить, что всхожесть семян сохраняется в течение 5-6 лет и у других представителей трибы Brassiceae, в частности *Raphanus sativa* L. и *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* (DC.) Zenker. и *Raphanus raphanistrum* L. (Roberts, 1983).

Оценка успешности опыления и оплодотворения показала, что в завязи у *B. taurica* оплодотворенные семязачатки составляют около 70% от их общего числа (табл. 3), что свидетельствует о высокой жизнеспособности женской генеративной сферы данного вида и эффективном половом процессе. Однако, около 20% семян не вызревает, что снижает семенную продуктивность до 50%. В то же время в пересчете на соцветие средние показатели плодообразования *B. taurica* составляют 64%. Фактором, ограничивающим реальную семенную продуктивность генеративных побегов *B. taurica*, является повреждение плодов и семян фитофагами, а также невызревание части плодов, что, вероятно, обусловлено особенностями распределения пластических ресурсов особи.

Наблюдения за состоянием и возрастным составом ценопопуляции *B. taurica* в районе мыса Мартыян показало, что пять растений данного вида, из которых две особи генеративные, отмеченные в мае 2005 года, к концу года погибли. Однако, осенью 2005 года численность особей данной ценопопуляция была возобновлена 47 проростками. После зимнего периода 2005-2006 гг. количество проростков *B. taurica* снизилось и составило 44,6% от их первоначального числа. В последующие годы наблюдений единичные особи переходили в генеративное состояние, а после диссеминации отмирали. Следует отметить, что массовое посещение людьми прибрежной зоны, к которой приурочено произрастание *B. taurica*, губительно сказывается на численности особей данного вида.

Таблица 3. Завязываемость семян в плодах *Brassica taurica*

Год исследования	Генеративные структуры	Среднее арифметическое, $M \pm m$, шт.	Среднее квадратичное отклонение, σ	V, %
2005*	завязавшиеся семена	12,81±0,89	1,54	12,02
	выполненные семена	7,72±1,27	2,20	28,49
2006	семязачатки	21,86±2,07	2,93	13,40
	завязавшиеся семена	14,55±2,12	2,99	20,55
	выполненные семена	11,01±2,66	3,76	34,15
2007	семязачатки	24,35±1,45	2,05	8,42
	завязавшиеся семена	18,31±1,41	1,99	10,87
	выполненные семена	12,96±0,13	0,18	1,39

* – в 2005 г. учет количества семязачатков в завязях не производился.

Выводы

Основные цитозембриологические признаки *B. taurica* находятся в пределах типичных характеристик, свойственных представителям семейства Brassicaceae: пятислойная стенка микроспорангия; секреторный тапетум, представленный двудерными клетками; симультанный тип микроспорогенеза; трехклеточные пыльцевые зерна; медионуцеллярный, битегмальный, ана-амфитропный семязачаток; развитие

зародышевого мешка по Polygonum-типу; нуцеллярный эндосперм; Onagrad-тип эмбриогенеза; дифференцированный зародыш.

Репродуктивная система *B. taurica* характеризуется комплексом адаптивных признаков, обуславливающих надежность аллогенного типа опыления, что выражается в мультипликации соцветий, дублировании количества семязачатков в завязи и числа закладывающихся микроспороцитов и формирующихся пыльцевых зерен, а также продолжительности жизнеспособности генеративных структур.

Характер строения и периоды жизнеспособности генеративных структур *B. taurica* потенциально способны обеспечить эффективную половую репродукцию вида, а высокая жизнеспособность семян создает предпосылки для его успешного семенного возобновления в пределах исследуемых ценопопуляций.

Литература

- Веллингтон П. Методика оценки проростков семян – М.: Колос, 1973. – 175 с.
- Вишнякова М.А. Эволюционная преемственность структурных механизмов гаметофитного и спорофитного типов реакции самонесовместимости // Ботан. журн. – 1997. – Т. 82, № 8. – С.1-17.
- Вопросы развития Крыма Материалы к Красной книге Крыма: Научно-практический дискуссионно-аналитический сборник / Сост. В.В. Корженевский, А.В. Ена, С.Ю. Костин. – Симферополь: Таврия-плюс, 1999. – Вып. 13.– 164 с.
- Жинкина Н.А., Воронова О.Н. О методике окраски эмбриологических препаратов // Ботан. журн. – 2000. – 85, № 6. – С. 168-171.
- Каталог видів флори і фауни України, занесених до Бернської Конвенції про охорону дикої флори і фауни та природних середовищ існування в Європі. – Вип. перший. Флора. – Київ: Фітосоціоцентр, 1999. – 52 с.
- Методические рекомендации по изучению антропоэкологических особенностей цветковых растений. Морфологическое описание репродуктивной структуры / Сост.: В.Н.Голубев, Ю.С. Волокитин. – Ялта: ГНБС, 1986. – 43 с.
- Методологические указания по фенологическим наблюдениям над деревьями и кустарниками при их интродукции на юге СССР / Сост.: И.В. Голубева, Р.В. Галушко, А.М. Кормилицин. – Ялта, 1977. – 25 с.
- Минин Д.Д. Сбор и хранение семян древесных и кустарниковых пород. – М.-Л.: Гослесбумиздат. – 1949. – 85 с.
- Никифоров А.Р. Интродукция растений редких видов флоры Крыма и ее использование для оптимизации экосистем региона // Экология, фитоценология и оптимизация экосистем: Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 2004. – Т. 123. – С. 212-219.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений – М.: Колос, 1970. – 255 с.
- Уранов А.А. Вопросы изучения структуры фитоценозов и видовых ценопопуляций // Ценопопуляции растений. Развитие и взаимоотношение. – М.: Наука, 1977. – С. 8-20.
- Федоров Ал.А., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. Цветок. – Л.: Наука, 1975. – 352 с.
- Шевченко С.В., Ругузов И.А., Ефремова Л.М. Методика окраски постоянных препаратов метиловым зеленым и пиронином // Бюл. Гос. Никит. ботан. сада. – 1986. – Вып. 60. – С. 99-101.
- Шевченко С.В., Чеботарь А.А. Особенности эмбриологии маслины европейской (*Olea europaea*) // Цитолого-эмбриологические исследования высших растений: Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 1992. – Т. 113. – С. 52-73.
- Цвелев Н.Н. О некоторых более редких растениях Европейской части СССР // Новости систематики высших растений: Сб. трудов. – М.-Л.: Наука, 1970. – Т. 6. – С. 294 – 301.
- Червона книга України. Рослинний світ / Ред. Я.П. Дідух. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.

- Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. Vascular plant of Ukraine: A nomenclature checklist – Kiev, 1999. – 346 p.
- Roberts H.A. Seed survival species and periodicity of seedling emergence in eight // Ann. Appl. Boil. – 1983. – Vol. 103, № 2. – P. 301-304.