

Г. М. Анисимова

## Развитие и строение пыльника у *Kalanchoe laxiflora* и *K. tubiflora* (*Crassulaceae*) в условиях интродукции

G. M. Anisimova

Anther development and structure in *Kalanchoe laxiflora* and *K. tubiflora* (*Crassulaceae*) under introduction conditions

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург  
galina0353@mail.ru

Изучен морфогенез андроеца, строение и формирование пыльника, тетрад микроспор и пыльцевых зерен у двух видов рода каланхое — *Kalanchoe laxiflora* и *K. tubiflora* (*Crassulaceae*). В Северо-Западном регионе эти суккулентные растения произрастают лишь в условиях интродукции (оранжереях). Андроец представлен 8 тычинками, расположенными в 2 кругах. Стенка микроспорангия формируется по типу двудольных. В сформированном состоянии она состоит из эпидермиса, эндотеция, средних слоев (2 у *K. laxiflora* и 2–4 у *K. tubiflora*) и секреторного тапетума, клетки которого у *K. laxiflora* становятся нерегулярно 2-ядерными. Микроспорогенез сопровождается образованием тетрадральных, реже изобилатеральных тетрад микроспор. Зрелые пыльцевые зерна 2-клеточные, 3-бороздно-оровые. У исследованных видов обнаружена аномальная пыльца, отличающаяся по строению и размерам. Наличие пыльцевых зерен с отклонениями, вероятно, является одной из причин низкой фертильности пыльцы.

**Ключевые слова:** андроец, пыльник, *Crassulaceae*, *Kalanchoe laxiflora*, *Kalanchoe tubiflora*.

Семейство *Crassulaceae* включает от 1400 до 1700 видов из 40–55 родов (Бялт, 2011). Однако вопрос об объеме некоторых родов семейства является до настоящего времени дискуссионным. Прежде всего это касается двух родов — *Kalanchoe* Adans. и *Bryophyllum* Salisb. Некоторые ботаники рассматривают *Bryophyllum* в ранге самостоятельного рода, а другие в ранге секции рода *Kalanchoe*. Род *Kalanchoe* в широком смысле (включая *Bryophyllum*) насчитывает около 200 видов (Виноградова, 1981).

Исследования репродуктивной биологии растений дают целостное представление о системе размножения видов и имеют большое значение, особенно у растений, произрастающих в условиях интродукции (Шамров, Бабро, 2008). Нами проводится мониторинг развития генеративных структур видов каланхое из коллекции Ботанического сада Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (БИН РАН) (около 40 видов). Наблюдения показали, что большая часть видов цветет и плодоносит. Одним из важнейших показателей успешной адаптации растений в условиях интро-

дукции является их способность продуцировать жизнеспособные семена.

Представители рода *Kalanchoe* часто используются как модельные объекты для биохимических и физиологических исследований. Развитие генеративных структур, в том числе андроеца и пыльника, у представителей этого рода изучено фрагментарно (Carraro, Lombardo, 1976; Rudramuniyappa, Annigeri, 1984; Никитичева, 1985; Камелина, 2009; и др.).

### Материал и методика

В настоящей работе исследовались растения двух видов рода каланхое — *Kalanchoe laxiflora* Baker и *K. tubiflora* (Harv.) Hamet (Allorge, 1995). Материалом для исследования послужили растения коллекции Ботанического сада БИН РАН. Наблюдения за растениями и сбор материала проводились в течение 2009–2014 гг.

Для фиксации бутонов и цветков на разных стадиях развития использовали смесь FAA (70°-ный этиловый спирт, 40%-ный формалин, ледяная уксусная кислота в пропорции 100 : 7 : 7). Дегидратация, инфильтрация парафином и окраска препаратов проводилась по общепринятой методике (Паушева, 1974). Срезы толщиной 10–12 мкм окрашивали фуксин-сернистой кислотой по Фельгену (ядра клеток) с подкраской гематоксилином по Эрлиху (цитоплазма) и алциановым синим (стенки клеток). Фертильность свежесобранной пыльцы определяли проращиванием ее на питательной среде, состоящей из 1%-ного раствора агар-агара и сахарозы с разной концентрацией (1, 3, 5, 7, 10 и 15 %) при температуре 23–26 °С (Барыкина, Транковский, 1963). Статистическая обработка данных проведена по общепринятой методике (Зайцев, 1990). Вычисления проводились с помощью электронной таблицы Excel программы Microsoft Office (2003).

Электронно-микроскопическое исследование пыльцевых зерен проведено в Центре коллективного пользования БИН РАН на сканирующем электронном микроскопе Jeol JSM-6390 LA.

### Результаты исследования

**Андроец** исследованных видов представлен 8 тычинками (рис. 1, 1), которые прикрепляются к вну-

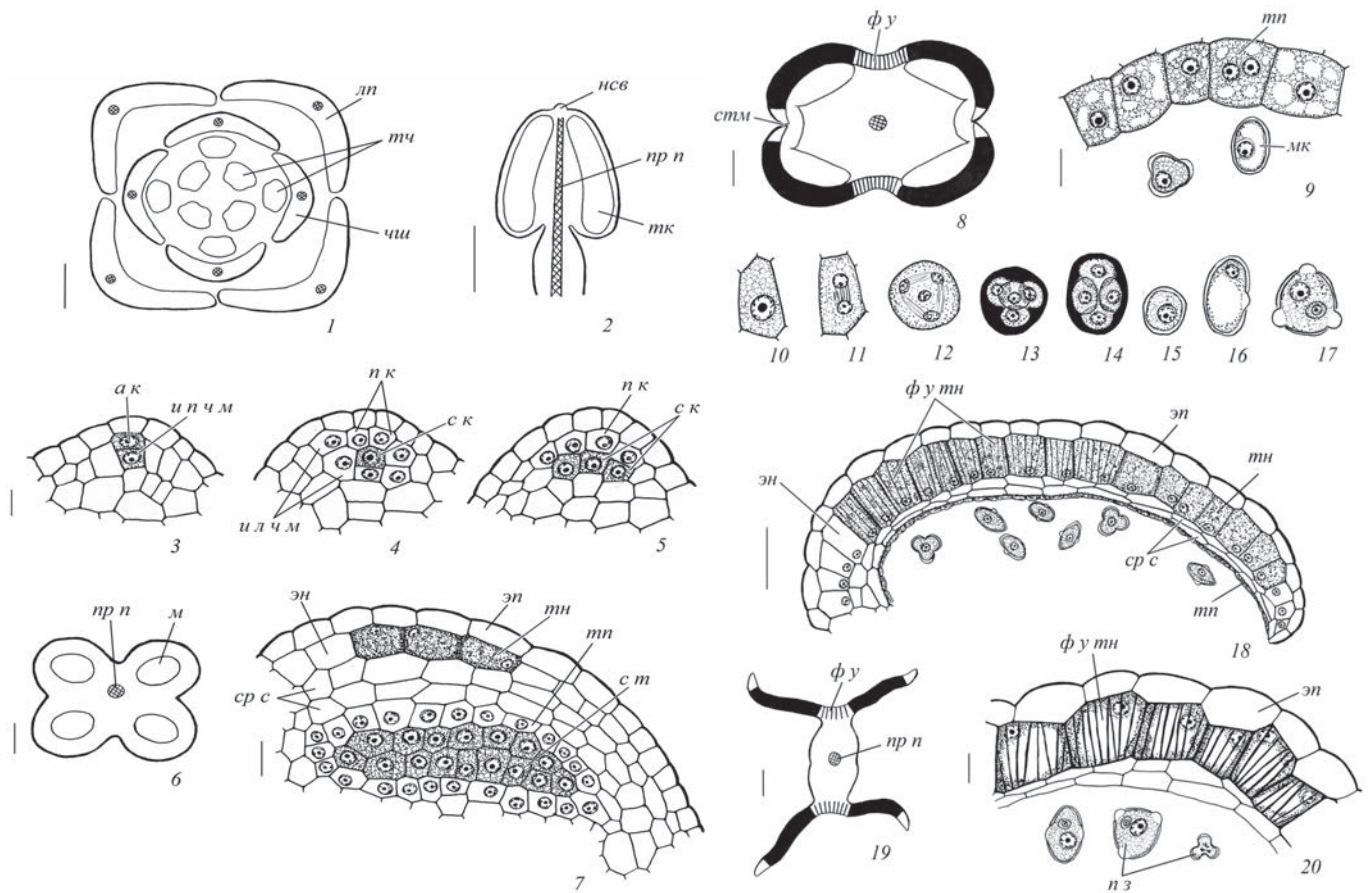


Рис. 1. Строение и развитие пыльника *Kalanchoe laxiflora*.

1 — схема строения цветка на поперечном срезе; 2 — схема строения тычинки на продольном срезе; 3–20 — строение пыльника на поперечных срезах: 3–5 — ранние стадии формирования стенки микроспорангия, 6, 8, 19 — схемы пыльника, 7 — сформированная стенка микроспорангия, 9 — строение тапетума после распада тетрады микроспор, 10–17 — микроспорогенез и формирование пыльцевого зерна, 20 — стенка зрелого микроспорангия. ак — археспориальная клетка, и л ч м — инициали латеральной части микроспорангия, и п ч м — инициали проксимальной части микроспорангия, лп — лепесток, нсв — надсвязник, м — микроспорангий, мк — микроспора, н з — пыльцевое зерно, н к — парietальная клетка, пр п — проводящий пучок, с к — спорогенная клетка, ср с — средний слой, с т — спорогенная ткань, стм — стомиум, тк — тека, тн — танины, тп — тапетум, тч — тычинка, ф у — фиброзные утолщения, ф у тн — фиброзные утолщения и танины, чш — чашелистик, эн — эндотеций, эп — эпидермис. Масштабная линейка, мкм: 1, 6, 8, 19 — 100; 2 — 500; 3–5, 7, 9–17, 20 — 10; 18 — 50.

тренней стороне нижней части венчика и расположены в два круга. Тычиночная нить на ранних стадиях развития слегка уплощенная и немного изогнутая, в зрелом состоянии значительно длиннее пыльника. Проводящая система тычиночной нити продолжается в связнике пыльника (рис. 1, 2; 2, 1). Массивный связник в зрелом пыльнике состоит из паренхимных клеток, в некоторых из них формируются фиброзные утолщения. Вокруг проводящего пучка отдельные клетки связника заполнены глобулярными включениями (возможно, танинами). В апикальной части пыльников как продолжение связника наблюдали небольшой вырост — надсвязник (рис. 1, 2).

На ранних стадиях развития (до формирования лопастей) пыльник имеет цилиндрическую, а позднее при созревании приобретает пирамидальную форму (рис. 1, 2). Длина сформированного пыльника 1.2–1.5 мм. Он вскрывается двумя продольными щелями (рис. 1, 6, 8, 19; 2, 2, 6, 15). На ранних стадиях развития пыльник на поперечных срезах имеет овальную форму

(рис. 1, 1) и состоит из меристематических изодиаметрических клеток. Затем (сначала в тычинках верхнего круга) за счет интенсивных делений клеток формируются 4 лопасти — будущие микроспорангии.

Обычно при типизации стенки микроспорангия последовательность возникновения ее слоев описывают только с дистальной стороны, начиная с момента дифференциации археспория (Davis, 1966). Наше исследование показало, что у видов *Kalanchoe*, как и у ранее изученных видов, например *Rhododendron* из сем. *Ericaceae* (Шамров, Бабро, 2008), еще до выделения археспория в субэпидермальном слое каждого гнезда пыльника дифференцируется группа инициальных клеток, которые образуют как слои микроспорангия, так и археспориальные клетки. Следовательно, эти субэпидермальные клетки являются инициалами всего микроспорангия (стенки микроспорангия и археспория). После периклинального деления центральной субэпидермальной клетки наружу отделяется археспориальная клетка, а внутрь — клетка, из которой

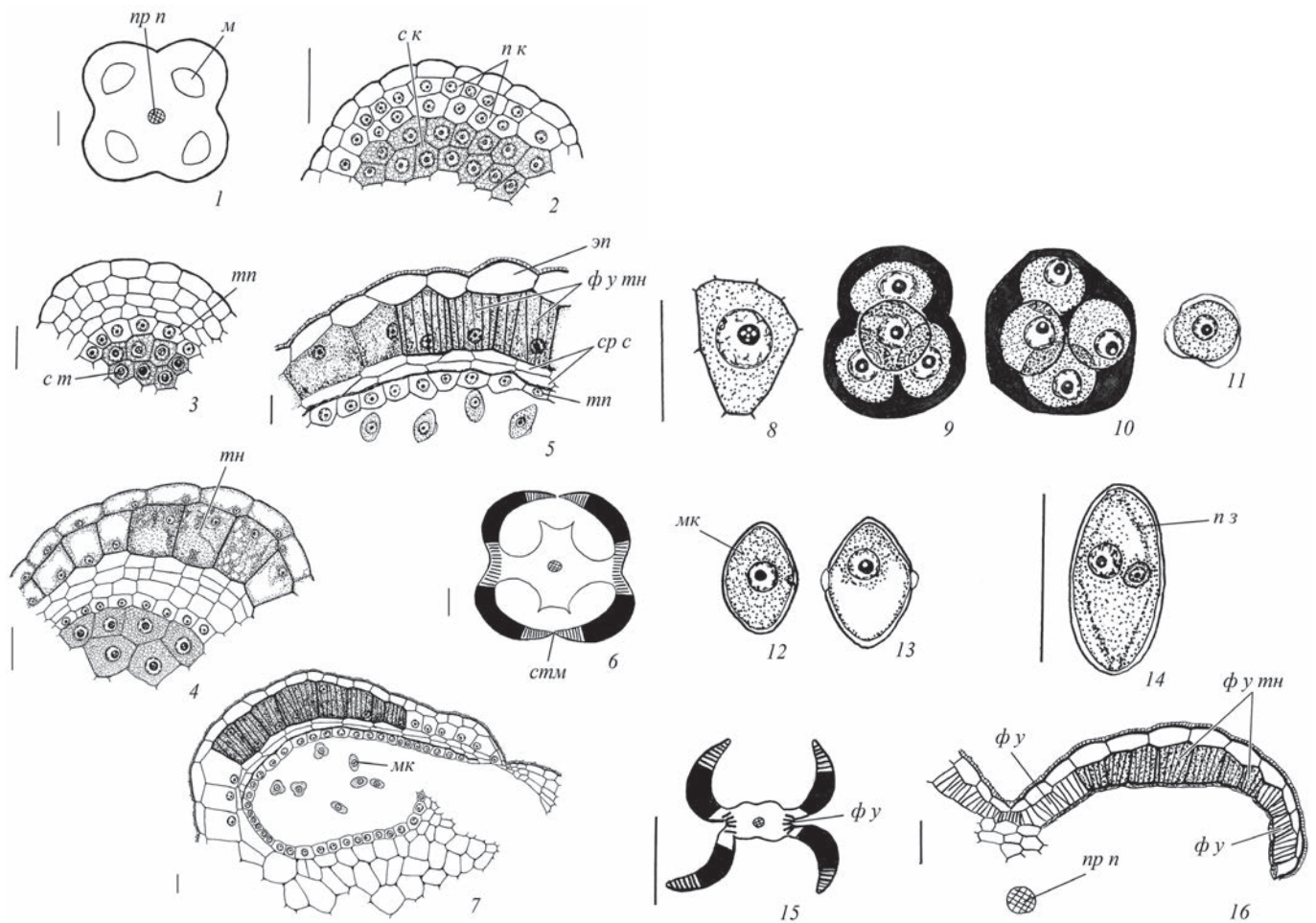


Рис. 2. Строение и развитие пыльника *Kalanchoe tubiflora*.

1, 6, 15 — схемы пыльника на поперечных срезах на разных стадиях развития; 2–4 — формирование стенки микроспорангия; 5, 7 — строение стенки микроспорангия после распада тетрад микроспор; 8–10 — микроспорогенез и формирование тетрад микроспор; 11–13 — стадии развития микроспор; 14 — зрелое пыльцевое зерно; 16 — стенка зрелого микроспорангия. Обозначения см. рис. 1. Масштабная линейка, мкм: 1, 6, 16 — 50; 2–5, 7–14 — 20; 15 — 500.

формируется проксимальная (со стороны связника) часть стенки микроспорангия (рис. 1, 3). Латеральные субэпидермальные клетки за счет делений образуют латеральные части стенки микроспорангия (рис. 1, 4, 5).

В результате периклиальных делений археспориальных клеток возникают париетальный (наружный) и спорогенный (внутренний) слои. Клетки париетального слоя формируют дистальную часть стенки микроспорангия (рис. 1, 5, 7).

Клетки париетального слоя делятся периклиально на наружный и внутренний слои (рис. 2, 2). Клетки внутреннего париетального слоя первыми дифференцируются в клетки тапетума. Затем из клеток наружного париетального слоя формируются эндотеций и — последними — средние слои (рис. 2, 3). **Сформированная стенка микроспорангия** состоит из эпидермиса, эндотеция, средних слоев (2 у *K. laxiflora* и 2–4 у *K. tubiflora*) и тапетума (рис. 1, 7; 2, 4).

Клетки эпидермиса небольших размеров. В процессе развития пыльника они вытягиваются в поперечном направлении. К моменту созревания пыльника их

внутренние периклиальные и антиклинальные стенки утолщаются (рис. 1, 7, 18, 20). На наружных тангентальных стенках откладывается толстый слой кутикулы, у *K. tubiflora* в виде небольших шипиков (рис. 2, 7, 16). Клетки эндотеция также постепенно увеличиваются в размерах. В них сначала, преимущественно с наружной стороны пыльника, накапливаются танины (рис. 1, 7). Затем в этих клетках развиваются тонкие фиброзные утолщения. Позднее танины постепенно заполняют полость клеток, маскируя фиброзные утолщения. В остальных клетках эндотеция, а также некоторых клетках связника вокруг проводящего пучка, фиброзные утолщения без накопления танинов появляются после стадии одиночных микроспор (рис. 1, 18). Изученные виды различаются строением клеток эндотеция. У *K. tubiflora* фиброзные утолщения в них образуются почти по всей стенке микроспорангия до области стомиума. Но танины у этого вида накапливаются в ее средней части (рис. 2, 7, 16). У *K. laxiflora* фиброзные утолщения и танины обнаруживаются в большинстве клеток эндотеция, за исключением области стомиума (рис. 1, 7, 8, 18–20).



Клетки средних слоев тонкостенные, небольших размеров и, как клетки эпидермиса, вытянуты в поперечном направлении. После распада тетрад микроспор они начинают дегенерировать (рис. 1, 7, 18, 20; 2, 4, 5, 7, 16).

Клетки секреторного тапетума на ранних стадиях густоплазменные, одноядерные (рис. 2, 3–5, 7). По мере развития они постепенно увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, и у *K. laxiflora* некоторые из них становятся 2-ядерными (рис. 1, 7, 9). В процессе микроспорогенеза клетки тапетума постепенно сжимаются и в зрелом пыльнике представлены в виде очень тонкого слабо различимого слоя (рис. 1, 18, 20; 2, 16).

**Микроспорогенез.** Спорогенная ткань двуслойная (рис. 1, 7; 2, 2–4). Одновременно с развитием стенки пыльника в каждой его лопасти в результате последовательных митотических делений спорогенных клеток формируются микроспороциты. В результате мейоза и последующих процессов цитокинеза образуются тетраэдральные, реже изобилатеральные тетрады, состоящие из 4 гаплоидных микроспор. Они окружены каллозой, которая постепенно резорбируется. Разрушается также общая материнская оболочка тетрад, и они распадаются на отдельные микроспоры (рис. 1, 9–16, 18; 2, 8–11).

Зрелые пыльцевые зерна овально-продолговатые, одиночные, 2-клеточные, 3-бороздно-оровые (рис. 1, 17, 20; 2, 14). Скульптура пыльцевых зерен струйчатая, на полюсах более гладкая. Размеры пыльцевых зерен в среднем составляют  $34.09 \times 26.49$  мкм у *K. laxiflora* и  $45.12 \times 18.52$  мкм у *K. tubiflora*. У исследованных видов в зрелом пыльнике наряду с типичными обнаружены пыльцевые зерна, которые отличаются строением и, как правило, меньшими размерами (рис. 1, 20). Их размеры в среднем  $21.24 \times 12.44$  мкм у *K. laxiflora* и  $24.49 \times 18.62$  мкм у *K. tubiflora*.

При изучении фертильности пыльцы была выявлена оптимальная концентрация сахарозы, необходимая для прорастания пыльцевых зерен. Такими концентрациями были 3, 5 и 7 %. В дальнейшем пыльцевые зерна прорастивали на питательной среде с концентрацией сахарозы 3 %. Средние показатели жизнеспособности пыльцы по всем годам исследования находятся на уровне низких (*K. tubiflora* —  $34.34 \pm 2.98$  %) либо средних (*K. laxiflora* —  $52.49 \pm 3.78$  %) значений.

### Обсуждение

Проведенное исследование показало, что у *K. laxiflora* и *K. tubiflora*, хорошо различающихся по ряду морфологических признаков, развитие и строение пыльника, микроспорогенез и формирование пыльцевого зерна происходят сходно. Различия касаются особенностей строения эндотеция и жизнеспособности зрелых пыльцевых зерен. Полученные нами данные дополняют характеристику сем. *Crassulaceae* в отношении структуры пыльника и основных эмбриологических процессов во время микроспорогенеза и

развития пыльцевого зерна (Carraro, Lombardo, 1976; Rudramuniyappa, Annigeri, 1984; Никитичева, 1985). Однако, в отличие от результатов, полученных по *Sedum maximum* (Никитичева, 1985), свидетельствующих о накоплении танинов в клетках эпидермиса, у исследованных видов каланхое танины обнаруживаются в эндотеции и не выявлены в эпидермисе. Возможно, такая особенность присуща растениям, относящимся к разным родам сем. *Crassulaceae*. Кроме того, нам удалось проследить самые ранние стадии развития микроспорангия еще до дифференциации археспория. Мы подтвердили литературные сведения (Никитичева, 1985; Камелина, 2009), что с дистальной стороны стенки микроспорангия формируется по типу двудольных (Davis, 1966) или центробежного типа (Терёхин и др., 1993).

Как уже указывалось выше, средние показатели жизнеспособности пыльцы *K. tubiflora* —  $34.34 \pm 2.98$  %, *K. laxiflora* —  $52.49 \pm 3.78$  %. Ранее нами были получены данные о том, что фертильность пыльцы *K. tubiflora* составляет 33.6 % (Анисимова, 2011), а *K. laxiflora* — 48.6 % (Анисимова, 2013). Невысокие показатели фертильности пыльцы, вероятно, связаны с условиями, в которых проходят процессы микроспорогенеза и развития пыльцевых зерен, приводящие к формированию значительной доли аномальных пыльцевых зерен, отличающихся от нормальных (жизнеспособных).

Изучение семенной продуктивности показало, что у *K. tubiflora* большая часть зрелых семян (около 90 %) являются нежизнеспособными, составляя среднюю (с недоразвитым зародышем и эндоспермом либо без зародыша и эндосперма) и мелкую (без зародыша и эндосперма) фракции. В семенах крупной фракции (около 10 %) формируются типичный зародыш и эндосперм. У *K. laxiflora* в зрелых плодах преобладают (40–50 %) выполненные, способные к прорастанию семена крупной фракции (Анисимова, 2011, 2013).

Таким образом, выявляется корреляция между фертильностью пыльцы и качеством семян у изученных видов: у *K. laxiflora* эти показатели выше, чем у *K. tubiflora*. Вместе с тем, низкое качество семян у *K. laxiflora*, возможно, обусловлено целым комплексом причин: отсутствием опылителей, и, по-видимому, необходимостью облигатного перекрестного опыления; нарушениями в прогамной и постгамной фазах процесса оплодотворения и развитии зародыша и эндосперма, особенно на ранних стадиях; наличием механизмов самонесовместимости и формированием эмбриолеталей.

Возможно, что под действием экологического стресса в условиях оранжерей полноценно реализуется только бесполой способ репродукции посредством вегетативного размножения. Следует подчеркнуть, что у изученных нами видов наряду с семенным размножением репродуктивные стратегии включают вегетативный фолиарный тип вивипарии (Брагина, 2001; Батыгина и др., 2006). Виды каланхое хорошо размножаются черенками и пропагулами, образующимися

на листьях. Молекулярно-генетические исследования рода *Kalanchoe* показали, что при образовании нежизнеспособных семян происходит потеря функции гена *LEC1*, что вызывает высыхание в них зародышей. В этом случае при образовании новых организмов на листьях происходит совмещение программ органогенеза и соматического эмбриогенеза (растеньица проходят глобулярную, сердечковидную стадии и фазу с семядолеподобными листьями). Однако, в отличие от зародышей, у них отсутствует апекс корня, придаточные корни возникают в основании гипокотила и нет связи проводящей системы растеньица с материнским растением. Корневая система развивается лишь после отделения от листа и опадения его на почву (Garcês et al., 2007).

### Благодарности

Работа выполнена в соответствии с плановой темой лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН и темой гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ № НШ-5282.2014.4.

Автор благодарит И. М. Васильеву, Л. А. Карцеву, Е. Д. Петрову, Е. Л. Романову и И. И. Шамрову за ценные советы и помощь при выполнении работы.

### Список литературы

- Анисимова Г. М. Репродуктивное состояние *Kalanchoe tubiflora* (Harv.) Namet в коллекции БИН РАН // Биологическое разнообразие. Интродукция растений (Материалы 5-й междунар. науч. конф., 15–17 ноября 2011 г. Санкт-Петербург, Россия). СПб., 2011. С. 75–77.
- Анисимова Г. М. Репродуктивное состояние *Kalanchoe laxiflora* Baker (*Crassulaceae*) в условиях интродукции // Современная ботаника в России: Тр. XIII съезда Рус. ботан. о-ва и конф. «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна» (Тольятти, 16–22 сентября 2013). Т. 1. Тольятти, 2013. С. 7–8.
- Барыкина Р. П., Транковский Д. А. Практикум по анатомии растений. М., 1963. 179 с.
- Батыгина Т. Б., Брагина Е. А., Ересковский А. В., Островский А. Н. Живорождение у растений и животных: беспозвоночные и низшие хордовые: Учеб. пособие. СПб., 2006. 134 с.
- Брагина Е. А. Репродуктивная биология живородящих растений (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, *B. daigremontianum* (Hamet et Per.) Berger и *Hammarbya paludosa* (L.) Ktze.): Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2001. 359 с.
- Виноградова В. М. Семейство толстянковые (*Crassulaceae*) // Жизнь растений. М., 1981. Т. 5, ч. 2. С. 163–166.
- Зайцев Г. Н. Математика в экспериментальной ботанике. М., 1990. 296 с.
- Камелина О. П. Семейство *Crassulaceae* // Систематическая эмбриология цветковых растений: Двудольные. Барнаул, 2009. С. 241–242.
- Никитичева З. И. Семейство *Crassulaceae* // Сравнительная эмбриология цветковых растений. Т. 3: *Brumeliaceae* — *Tremandraceae*. Л., 1985. С. 29–34.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1974. 288 с.
- Терехин Э. С., Батыгина Т. Б., Шамров И. И. Классификация типов стенки микроспорангия у покрытосеменных. Терминология и концепции // Ботан. журн. 1993. Т. 78, № 6. С. 16–24.
- Шамров И. И., Бабро А. А. Развитие и строение пыльника у *Rhododendron schlippenbachii* и *R. luteum* (*Ericaceae*) // Ботан. журн. 2008. Т. 93, № 8. С. 1219–1239.
- Allorge L. *Kalanchoe* (*Crassulacées*) de Madagascar. Paris, 1995. 252 p.
- Carraro L., Lombardo G. Tapetal ultrastructural changes during pollen development. II. Studies on *Pelargonium zonale* and *Kalanchoe obtusa* // Caryologia. 1976. Vol. 29, № 3. P. 339–344.
- Garcês H. M. P., Champagne C. E. M., Townsley B. T. et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104, № 39. P. 15578–15583.
- Rudramuniyappa C. K., Annigeri B. C. A histochemical study of meiocytes, microspores, pollen and tapetum in *Kalanchoe* // Nord. J. Bot. 1984. Vol. 4, № 5. P. 661–667.