

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 630*165.51; 575.174.015.3

СОВМЕСТИМОСТЬ ТКАНЕЙ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ СОСНЫ

© 2013 г. М. Г. Романовский, Л. В. Хромова

Институт лесоведения РАН

143030 с. Успенское Одинцовского р-на Московской обл.

E-mail: michrom@ilan.ras.ru

Поступила в редакцию 20.09.2011 г.

Внутривидовая совместимость клеток разных особей, поколений стоит в ряду извечных проблем полового размножения. У хвойных мы наблюдаем наследие папоротников – совместимость, определяемую взаимодействием эмбриона и женского гаметофита. Несовместимость зародышей и эндоспермов вызывает гибель эмбрионов и появление пустых семян. Зародыш получает только отцовские пластыды. Материнские пластыды яйцеклетки перед оплодотворением отчуждаются в тельцах Гофмейстера. Два типа пластид присутствуют в популяциях сосны обыкновенной. При несовпадении типа отцовских и материнских пластид зародыш совместим с эндоспермом. Гибель женских гаметофитов второго года до оплодотворения, ведущая к образованию “недоразвитых” семян, не связана с внутривидовой совместимостью. Половина гамет у высокочереззерных сосен не синтезирует копии молекул ДНК в количестве, достаточном для прохождения “распределительной” ценоцитной стадии развития макрогаметофита. Из-за недостаточного уровня политении одной из хромосом в гаплотипе функциональной макроспоры макрогаметофит погибает, не завершив развития. Политения сохраняется в клетках проэмбрио хвойных. В культуре тканей соматический эмбриогенез начинается с образования крупных клеток-трубок, также, вероятно, политенных.

Сосна, перекрестная совместимость, пустосемянность, недоразвитые семена.

Эмбриологический этап развития сосны обыкновенной включает в широком смысле формирование мужских и женских стробилов, микро- и макроспорогенез, образование микро- и макрогаметофитов, гаметогенез, оплодотворение и эмбриогенез. Изучение эмбриологического этапа – надежный плацдарм для объяснения причинно-следственного хода событий, завершающихся образованием зрелого семени. Сосна обыкновенная изучена более других видов хвойных, как с точки зрения эмбриологического развития [41, 53, 54], так и статистики семеношения [23, 52]. Удобство исследования генеративной сферы сосны определяется ее специфическими особенностями: естественной подразделенностью роста семяпочек на два этапа – гаметофитный и эмбриональный; контрастом размеров семяпочек до и после оплодотворения; отсутствием партеноспермии (развитие неопыленных семяпочек и стробилов, свойственное другим родам хвойных); редкостью партенокопии (развитие зрелых шишек без семян); а также регулярностью семеношения, возможностью ретроспективных оценок урожая шишек, длительностью гаплоидной фазы и высокой надежностью выделения пустых семян по их окраске [23, 34, 52].

Совместимость – несовместимость клеток и тканей мужских и женских, гаплоидных и диплоидных направляет развитие семяпочки сосны от опыления до зрелого семени. Несовместимость – барьер, прерывающий развитие семяпочек. Поэтому важно понять ее причины, хотя бы на уровне гипотезы. У сосны обыкновенной несовместимость выражена появлением пустых семян. Вследствие самонесовместимости множество пустых семян образуется при самоопылении [23, 35 и мн. др.]. В настоящее время общепризнана гипотеза полулетающего происхождения пустосемянности. При комплектации полулетающей зародыш гибнет, возникает пустое семя [37, 46, 49, 51]. Цель нашей статьи – показать возможность совершенно иного, трофического объяснения пустосемянности, когда эмбрион погибает из-за отсутствия питания, обусловленного несовместимостью.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Статья основана на результатах оригинальных исследований семеношения сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L., выполненных авторами в

1980–1990 гг. в Московской области и в Украине (Киевская область) [23–27, 34–36]. Данные авторов обсуждаются на фоне анализа обширных литературных источников, посвященных проблеме совместимости (несовместимости) скрещивающихся растений. Как возможные количественные критерии совместимости у сосны рассмотрены пустосемянность [12, 17, 23, 34, 47, 52 и мн. др.] и частота образования недоразвитых мелких семян [11, 16, 26, 52, 56]. Новизну нашей работе придает привлечение данных электронно-микроскопических исследований цитоплазматических факторов совместимости и наследования пластид и митохондрий компонентами скрещивания [1, 19, 29, 30, 37–40, 45, 58], а также данных о политемии эмбриологических структур [3, 9, 50]. Ранее в связи с проблемой перекрестной совместимости эти данные не рассматривались.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы совместимости / несовместимости и их эволюция. У хвойных внутривидовая несовместимость пыльцы с тканями спорофита, столь обычная у цветковых растений [33], не была обнаружена [47]. У сосны обыкновенной успешное формирование мужскими гаметофитами пыльцевых трубок, их совместимость с материнскими тканями нуцеллуса, – необходимое условие развития женского гаметофита, условие оплодотворения. Только в случае успешного развития микрогаметофита образуются пустые и полные семена. У сосны обыкновенной не обнаружено также нарушений сингамии, происходящих с заметной частотой. Это не позволяет говорить о проявлениях несовместимости до оплодотворения или на этапе слияния гамет [23, 31, 34, 42, 52]. Образование пустых семян у сосны является единственным очевидным выражением внутривидовой несовместимости клеток зародыша (диплоид $2n$) и эндосперма (гаплоид n). Самоопыление как наиболее яркий тест на внутривидовую несовместимость однозначно свидетельствует об ее реализации после оплодотворения, при взаимодействии зародыша с тканями женского гаметофита [47]. У цветковых растений этот тип несовместимости как исключение отмечен у какао [33].

Особенности внутривидовой несовместимости хвойных логически вытекают из путей эволюции высших растений и систематического положения голосеменных. У низших растений, бактерий, грибов вопрос совместимости решается на уровне контакта гаплоидных клеток, двух гаметофитов: $n-n$. Разноименные совместимые (“+” и “–”)

гаплоидные клетки сливаются, образуя диплоидную спору. Несовместимые одноименные клетки (“+” и “+” или “–” и “–”) не сливаются [7, 28 и др.]. Вопрос о контакте гамет с диплоидными клетками ($n-2n$) вообще не возникает. Его не существовало и у папоротников, у которых спермии контактируют с тканями гаплоидных заростков или с яйцеклеткой. У папоротников вопрос совместимости решается либо при контакте $n-n$, либо позже, при контакте новой зиготы, зародыша с тканями заростка: $2n-n$ [57]. Лишь у голосеменных гаплоидные клетки мужского гаметофита вступают в контакт с диплоидными тканями нуцеллуса семязачек материнского растения $n-2n$. Однако проявлений несовместимости пыльцы n с тканями нуцеллуса $2n$ семязачек у голосеменных не обнаружено, хотя скорость роста отдельных пыльцевых трубок в нуцеллусе сосны различается в 1.5–2 раза (рис. 1, врезка) [15, 23, 24, 34]. Различается и мощность каллозных чехликов, окружающих “свои” и “чужие” пыльцевые трубки и затрудняющих развитие микрогаметофитов *in vivo* [16]. У псевдотсуги оболочки пыльцевых трубок, прорастающих в нуцеллусе, подвергаются действию ферментных систем спорофита, оболочки “своих” пыльцевых трубок в большей мере деформируются [56]. Ни разу, однако, не

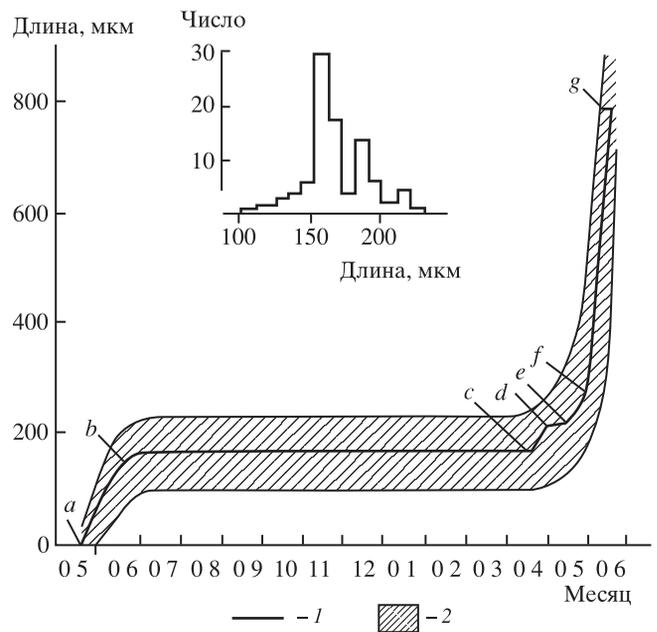


Рис. 1. Удлинение пыльцевых трубок в теле нуцеллуса [15, 23, 24, 34]

a-b – I год; *b-c* – период покоя; *c-d* – возобновление роста на II год; *d-e* – начало дифференциации архегониев; *e-f* – период разделения брюшной клетки и яйцеклетки; *f-g* – ускоренный рост перед оплодотворением (*g*); *1* – средняя длина пыльцевых трубок; *2* – область варьирования длины. На врезке распределение по длине пыльцевых трубок в период покоя *b-c*.

было отмечено полного подавления роста микрогаметофита тканями спорофита. R. Sarvas считал возможной конкуренцию пыльцевых трубок в тканях нуцеллуса по скорости роста, но не избирательное полное подавление их роста [52]. Эффект предпочтительного использования для оплодотворения чужой пыльцы убедительно показан при опылении гомозиготы пыльцевой смесью “своя – чужая” у *Pinus contorta* Dougl.: выход гетерозигот при этом в ~ 1.5 –2 раза превышал ожидание [48].

У голосеменных продолжает работать старый, возникший, вероятно, у папоротников, механизм определения внутривидовой совместимости $2n-n$: зародыш – макрогаметофит [23, 24]. Причем у голосеменных контакт пыльцевых трубок с нуцеллусом первоначально был, по-видимому, исключен, и пыльца, попав через микропиле в воронку архегониальной камеры, прорастала в ней. Туда же непосредственно из макрогаметофитов открывались шейки архегониев. Рудиментарные архегониальные камеры в нуцеллусе сохранились у некоторых современных представителей тиссовых и головчатотиссовых, имеющих в каждой семязпочке комплексы архегониев [30, с. 63].

У цветковых растений выяснение внутривидовой совместимости – несовместимости в подавляющем большинстве случаев переносится на момент контакта пыльцевой трубки с тканями материнского растения ($n-2n$); или даже раньше – пыльцевых оболочек (производных отцовского диплоида) с тканями рыльца ($2n-2n$) [33].

Внутривидовая несовместимость у хвойных выражается в смертности эмбрионов в период их развития в зародышевой камере (после точки g на рис. 1), как следствие образуются пустые семена. Совместимость (различие) или несовместимость (идентичность) эмбриона и гаплоидного эндосперма определяется у хвойных, по нашему мнению, их трофическим контактом. Зародыш, углубляясь в коррозионную камеру эндосперма, лизирует оболочки клеток по периферии камеры [30, 37, 42, 43, 52 и др.]. Для успешного питания зародыша ему необходимо распознать ткани макрогаметофита (эндосперм) как чужие. Если ткань идентифицирована как чужая, срабатывают механизмы разрушения мембран в контактирующих клетках. Неспособность зародыша к питанию генетически родственными клетками, лизируя их оболочки, ведет его к гибели и образованию пустого семени, что и происходит при самоопылении.

Трофическое доминирование зародыша, вероятно, определяется в какой-то мере его пloidно-

стью: $2n$ против $1n$ у клеток эндосперма и нередуцированной политенией клеток суспензора и проэмбрио [3, 9, 24, 30, 37]. Увеличенная копия ДНК в ядрах клеток проэмбрио и суспензора (“пуповины”, подвески зародыша) может определять адекватную активность обслуживающего митохондриального аппарата, что также будет способствовать усиленному поглощению веществ из зародышевой камеры [9, 19, 20].

Предполагаемый нами механизм образования пустых семян вследствие трофического взаимодействия макрогаметофита и зародыша коренным образом отличается от “полулетального” механизма пустосемянности, постулированного в работах V. Kosky, G. Namcoong, A. Griffin и многих других [37, 46, 49, 51 и др.]. Несовместимые с нуцеллусом или с тканями пестика микрогаметофиты или эмбрионы, несовместимые с тканями эндосперма, окажутся вполне жизнеспособны при перенесении их в иную биологическую среду. Зиготы с комплементарными полулетальными нежизнеспособны [49] (маложизнеспособны [46]) в любых условиях. В представлениях модели трофического взаимодействия клеток зародышевая совместимость голосеменных, пыльцевая совместимость цветковых растений и гистосовместимость у животных выстраиваются в единый ряд явлений. На основе внутривидового полиморфизма белков, контролирующих распознавание “свое – чужое”, осуществляется половое размножение.

Резкие колебания результативности самоопыления в чередующихся годах [12, 17] достаточно определенно свидетельствуют о том, что пустосемянность не служит выражением генетического груза популяций. При 15-летнем мониторинге результатов самоопыления 60 постоянных модельных особей сосны в Воронежской области отношение процентного выхода полнозернистых семян при самоопылении к процентному выходу полнозернистых семян при свободном опылении, названное авторами коэффициентом самофертильности, варьировало у самостерильных деревьев от 0.05 до 0.30 [12].

С полулетальной моделью пустосемянности не согласуется также избыточная изменчивость выживаемости проэмбрио и зародышей в разных макростробилах (шишках) и при разных вариантах скрещивания [23, с. 74]. О том же говорит чувствительность сохранности эмбрионов к помещению макростробила в изоляционный пакет при контролируемом опылении, выраженная особенно ярко у “высокочереззерных” сосен с малым числом семян в шишке [23, с. 44].

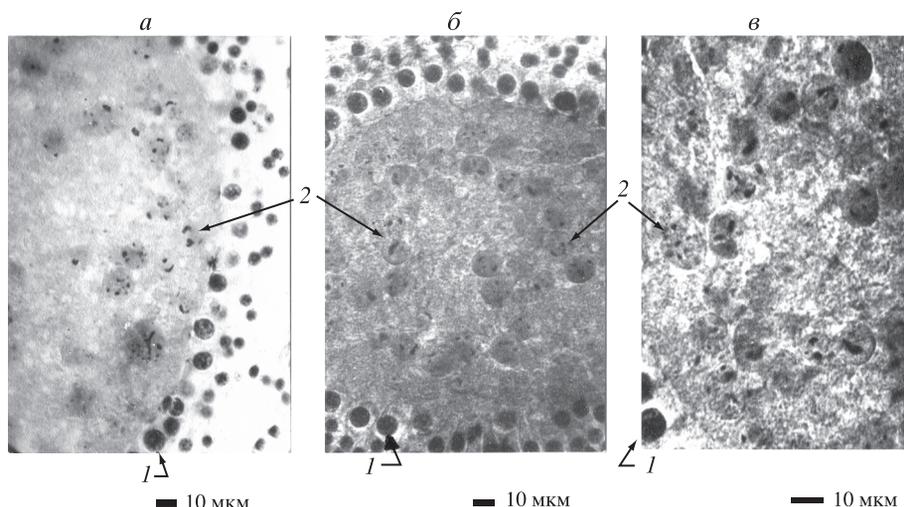


Рис. 2. Ядра клеток обкладки архегония (1) и Тельца Гофмейстера в яйцеклетке (2) *Pinus mugo* Turg. (*P. montana* Mill.)
 а – центральная клетка архегония перед отделением шейковой клетки; б – яйцеклетка перед оплодотворением; в – то же при большем увеличении.

На фоне колебаний по годам величины урожая и выхода полных семян дерева сохраняют свой специфический ранг самосовместимости [17]. Самосовместимость – самонесовместимость, вероятно, это лишь одно, самое яркое проявление общей внутривидовой совместимости. Самостерильные сосны (“перекрестники” [12]) составляют основную костяк размножающейся части популяции ~66% деревьев сосны обыкновенной. Более 90% деревьев сосны (самостерильные и частично самофертильные) предпочитают перекрестное опыление. Менее 10% особей отдают предпочтение самоопылению [12]. “Женкостерильные” формы с наследственно обусловленными нарушениями мейоза, отсутствием полных семян в шишках и одновременными нарушениями микроспорогенеза не играют особой роли в системе скрещиваний; их участие в размножающейся части популяций сосны обыкновенной ничтожно ~ 1–5% [22, 27, 31].

Тельца Гофмейстера (ТГ), пластиды. Критическую точку определения совместимости эмбриона и эндосперма у хвойных помогает нащупать загадочный процесс образования ТГ в цитоплазме яйцеклетки, готовящейся к оплодотворению.

Здесь уместно вспомнить о генезисе ТГ. Мелкие глобулярные образования в цитоплазме яйцеклетки И.Н. Горожанкин назвал “гофмейстеровыми тельцами”, поскольку впервые на них обратил внимание W. Hofmeister [6]. Они появляются в центральной клетке архегония сосны незадолго перед отделением канальцевой клетки и образованием яйцеклетки. Помимо известных ранее сведений о ТГ, И.Н. Горожанкин дал подробное

описание своих наблюдений на живом и зафиксированном в спирте материале, представляющее интерес и сейчас. Когда вакуоль, впоследствии дробящаяся тяжами протоплазмы, занимает середину образовавшейся яйцеклетки ТГ обнаруживаются в пристенном слое цитоплазмы и в ее тяжах. ТГ имеют сферическую или эллипсоидную форму, в последнем случае с ясной поперечной перегородкой. Они размножаются путем деления, причем из одного тельца вырабатывается сложный комплекс ТГ. В ТГ имеются ядра, в ядрах ядрышки. Комплексы ТГ окружены кожистой бесцветной оболочкой. На спиртовых препаратах оболочка ТГ отделена от их цитоплазмы.

По данным электронной микроскопии комплексы ТГ имеют двойную мембрану [14]. По В.В. Тренину ТГ центральной клетки архегония перед ее делением можно идентифицировать как гипертрофированные лейкопласты [29, 30, 37, 38]. В это время они содержат короткие ламеллы, редкие пластоглобулины и мелкие крахмальные зерна. В.В. Тренин определил “ядра” ТГ как хроматин, что подтверждает их контрастная окраска гематоксилином Гейденгейна, наблюдавшаяся Л.В. Хромовой [34]. “Глыбки” хроматина в ТГ окрашиваются так же, как хроматин ядер клеток обкладки архегония (рис. 2).

Когда в протоплазме яйцеклетки исчезают вакуоли, комплексы ТГ концентрируются по периферии клетки. После оплодотворения ТГ не всегда заметны и постепенно исчезают. С момента оплодотворения начинается деградация старой цитоплазмы яйцеклетки, включающей ТГ. Лизис старой цитоплазмы распространяется от ядра к периферии клетки. Новая цитоплазма (“неоци-

топлазма”) при электронно-микроскопическом исследовании отличается от старой, хотя граница между ними в виде оболочки отсутствует [40].

Концепция “неоцитоплазмы” французского эмбриолога Н. Camefort [39, 40], изложенная нами по работе В.В. Тренина [30], подразумевает полную замену пластид в яйцеклетке и далее в клетках зиготы и зародыша на отцовские, привнесенные пыльцевой трубкой. Митохондрии же у хвойных наследуются и по материнской, и по отцовской линии. У сосны обыкновенной митохондрии неоцитоплазмы происходят в основном (или полностью) из старой цитоплазмы женской гаметы [58], тогда как у тисса головчатого *Cephalotaxus drupaceae* исключительно из мужской [45].

Популяции пластид сосны представлены, вероятно, альтернативными линиями. Проведенный нами анализ исходных данных А.Г. Ковалева, фиксировавшего размеры и рост хлоропластов в хвое сосны из болотных популяций в Тверской области [13], обнаружил наличие двух вариантов пластома. Из 10 деревьев, обследованных А.Г. Ковалевым, четыре имели модалные размеры хлоропластов в клетках хвои 3.2×4.0 мкм, а шесть – 4.0×4.8 мкм. По замечанию автора это типичные размеры молодых пластид после их деления путем амитоza. К сожалению, исследование индивидуальной, подеревной изменчивости размеров пластид никогда не входило в задачи физиологов. Индивидуальная изменчивость так и осталась не замеченной. Полиморфизм пластид и митохондрий зафиксирован только в электронно-микроскопических эмбриологических исследованиях в связи с определением принадлежности этих органелл отцовскому или материнскому организму [37, 45, 58].

Воспринимая пластиды как древнейшие эндобионты растений, унаследовавшие особенности сине-зеленых водорослей [7], мы можем только удивляться длительности сохранения у них “+”- и “-”-линий. Создание неоцитоплазмы у голосеменных можно рассматривать как средство запрета видом-хозяином полового размножения вида-эндобионта.

Изоляция пластид в ТГ перед образованием неоцитоплазмы [29, 30] решает вопрос трофической совместимости у хвойных. Клетки материнского гаметофита (эндосперма) содержат только материнские пластиды. Многообразие типов цитоплазм зародышевых клеток создают отцовские пластиды. Это обеспечивает несовпадение пластома зародыша и эндосперма в 50% случаев при наличии в популяции двух равновероятных вариантов пластома (двух линий пластид). При

несовпадении зародыши воспринимают ткани материнских гаметофитов по их “пластому” как чужие и питаются ими. При наличии в среднем 2.1 гетеро эмбрионов [23, 52] – кандидатов на питание макрогаметофитом вероятность того, что пластом хотя бы одного из них окажется противоположен пластому матери составляет ~ 0.75 . Таким образом, $\sim 75\%$ зародышей смогут успешно развиваться питаясь тканью макрогаметофита, воспринимаемого как питательная среда – эндосперм.

Анализируя результаты R. Sarvas [52], мы обнаруживаем, что итог опыления в широком диапазоне от опыленности не зависит. Только при очень низкой опыленности недостаток пыльцы начинает влиять на ее содержание в пыльцевых камерах и частоту пыльцевых камер, оставшихся пустыми. В сосняках лесной зоны такие уровни опыленности встречаются очень редко ($\leq 5\%$ лет). В то же время, ежегодно в самых оптимальных условиях отмирает $>20\%$ семян [23]. Реально наблюдаемый опад макростробилов в ~ 5 раз превышает ожидаемый, рассчитанный исходя из числа пыльцевых камер, оставшихся без пыльцы [23, 52]. Но если учесть эмбриогенез, не состоявшийся в силу трофической несовместимости, из-за идентичности серотипов зиготы и материнского макрогаметофита, и эмбрионы, погибшие в зародышевых камерах опыленных семян, баланс частот сходится.

Очевидно, однако, что не один только механизм элиминации пластид яйцеклетки полностью определяет возможность питания зародыша материнскими тканями. Убийство материнских пластид должно было бы обеспечить гибель 100% зародышей при самоопылении. Однако фактически даже у самостерильных сосен в годы погодного комфорта 5–7% зародышей имеет возможность успешного питания и развития. В неблагоприятные годы при самоопылении самостерильных особей частота успешного развития семян возрастает до $\sim 30\%$ [12]. Это обстоятельство подсказывает возможное объяснение феномена самосовместимости у самостерильных сосен – рост мутационных изменений пластома в аномальные годы. Накопление в популяциях пластид разнообразных мутационных изменений ДНК позволяет распознать пластом как “чужой” и уничтожить клетку при питании.

Особенность самофертильных сосен видится в высокой гетерогенности и непостоянстве состава пластома. При неустойчивом пластоме преобладание в эндосперме мутантных линий пластид окажется достаточным для успешного питания

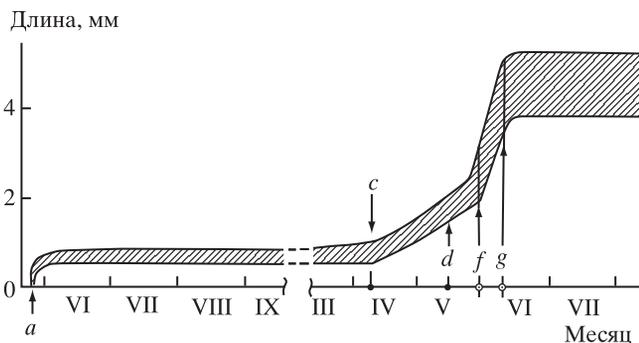


Рис. 3. Рост по длине семян сосны обыкновенной (Московская обл., 1996 г.)

Обозначения – см. рис. 1. Момент оплодотворения (*g*) совпадает с завершением роста семечки и началом склерификации семенной кожуры полных и пустых семян [23].

зародыша. В стрессовых условиях рост частоты мутаций в популяции пластид увеличит вероятность успешного развития зародышей (так же, как в случае самостерильных особей).

Объем пластидного генома примерно 10^2 – 10^3 генов [7, 28]. Численность популяций пластид по 60–100 экз. на клетку [13]. Ожидаемая частота мутационных событий 10^{-5} – 10^{-9} для консервативных мономорфных генов [8, 28] и 10^{-3} – 10^{-4} для полиморфных [2, 25]. Возможная встречаемость мутантных линий в клеточных популяциях пластид, при этом вполне достаточна для обеспечения наблюдаемых колебаний самофертильности [12, 17].

Итак, трофической “совместимостью” эмбриона и материнского макрогаметофита хвойных “командуют”, как мы предполагаем, пластиды. Зародыш хвойных, как, вероятно, и всех *Gymnospermae*, наследует отцовский, пыльцевой пластом.

У цветковых растений, наоборот, цитоплазматические факторы передаются исключительно по материнской линии, что определяет совершенно не похожие проявления внутривидовой несовместимости и характер наследования дефектов пластид у голосеменных и покрытосеменных растений.

У позвоночных животных отмечен процесс вывода из яйцеклетки материнских центриолей, чрезвычайно сходный с арестом ТГ у голосеменных растений. Центриоли перед оплодотворением исключаются из овоцита в полярные тельца, окруженные мембраной, и лизируются еще до начала первого деления мейоза [1].

Мелкие недоразвитые семена. Цитоплазматические факторы “плазмотип” (“плазмон” [18]), создаваемые разнообразием ДНК популяций

пластид и митохондрий (“пластом” и “митохондрионом”), определяют мужскую и женскую стерильность особей [16, 18, 22, 31, 33 и др.]. Мужская цитоплазматическая стерильность сельскохозяйственных растений обусловлена обычно генофондом внутриклеточной популяции митохондрий [8, 18, 33]. Женскую стерильность сосен, сопряженную с мужской, также, вероятно, контролирует митохондрион [22].

Популяции митохондрий контролируют совместимость половых клеток животных. У млекопитающих митохондрии, привнесенные сперматозоидами, уничтожаются при достижении зиготой 8-клеточной стадии развития. Зародыш сохраняет только материнскую популяцию митохондрий [19]. “Митохондрион” животных, передаваемый по женской линии, – аналог цитоплазматических факторов цветковых растений и антитеза “пластому” голосеменных растений, передаваемому по отцовской линии.

В нецитоплазму хвойных растений митохондрии поступают из яйцеклетки и пыльцевой трубки примерно в равных количествах [37]. Многотысячные внутриклеточные популяции митохондрий играют, очевидно, главную роль в определении стерильности особей [8, 18, 33 и др.]. Особенности цитоплазматических популяций митохондрий могут быть причиной регулярной массовой гибели семян у отдельных особей, изучавшихся И.Н. Третьяковой [31]. Однообразные популяции митохондрий определяют общность поведения клеток особи, органа, растения. Однако некоторые деревья сосны в период роста семян второго года развития (на рис. 1 и 3 – период между событиями *c* и *f*) демонстрируют женскую “полустерильность”. К моменту *g* (рис. 1, 3) примерно половина семян в макростробиле замедляет рост и погибает из-за неспособности макрогаметофитов завершить развитие, половина успешно достигает оплодотворения [23, 26]. У “высокочерезрезных” [11] форм сосны обыкновенной и кедра сибирского половина семян гибнет ежегодно. Такое неоднородное поведение семян вряд ли можно объяснить цитоплазматической несовместимостью.

После созревания урожая семян из раскрывшихся шишек сосны обыкновенной помимо семян с семенной кожурой нормального размера (пустых и полных) высыпаются мелкие семена длиной 1–3 мм. На семенных чешуях от них остаются мелкие реплики, “следы”. В целом шишка оказывается полупустой. Высокочерезрезные сосны в популяциях европейской южной тайги и в хвойно-широколиственных лесах составля-

ют 10–30% семеносящих деревьев. В некоторых окраинных популяциях и древостоях эта форма превалирует [23].

Образование мелких недоразвитых семян у сосны обыкновенной происходит до контакта микрогаметофита и макрогаметофита и не имеет отношения к вопросу о трофической внутривидовой совместимости эмбрионов и эндоспермов. Микрогаметофит в нуцеллусе мелких недоразвитых семян развивается нормально [26], но макрогаметофит погибает в начале второго сезона (отрезок *c-f* на рис. 3) на свободнойядерной стадии развития, причем его гибель никак не связана с состоянием микрогаметофита [26, 35, 36]. Семяпочки с погибшими макрогаметофитами и жизнеспособными микрогаметофитами продолжают наращивать размеры семенной кожуры параллельно с ростом нормальных семяпочек (будущих пустых и полных семян), хотя и отстают от нормы. Размеры семяпочек сосны обыкновенной увеличиваются вплоть до момента оплодотворения (точка *g* на рис. 3) [23].

В 1986 г., пытаясь понять причины гибели макрогаметофитов у высокочереззерных сосен, мы препарировали их семяпочки с первой декады апреля по вторую декаду июля. В нормально развивавшихся семяпочках высокочереззерных сосен (их судьба окончательно определилась за 10–20 дней до оплодотворения), так же как и в подавляющем большинстве семяпочек низкочереззерных сосен, 29 мая архегонии сформировали шейки, а женский гаметофит имел полностью целлюлярное строение. В тот же день, 29 мая, в семяпочках, отставших в росте (просмотрено более 200 семяпочек), мы наблюдали с примерно равной частотой следующие варианты состояния макрогаметофита: 1 – выделены инициали архегониев, микропилярная зона клеточная, халазальная – свободнойядерная; 2 – ценоцитный женский гаметофит; 3 – вместо женского гаметофита полость, окруженная дегенерирующими клетками нуцеллуса; 4 – полость макрогаметофита зарастает нуцеллярными клетками [26].

У высокочереззерных деревьев 50% макрогаметофитов гибнет до оплодотворения и только в 50% случаев происходит оплодотворение яйцеклеток. Устойчивость по годам данной индивидуальной особенности, наследование признака “высокой череззерницы” при семенном и вегетативном размножении свидетельствуют о прямом участии материнского генома в фенотипическом выражении этого признака [27].

Теперь нам придется привлечь к изложению еще одно явление, достаточно типичное для эм-

бриогенеза, но редко упоминаемое при интерпретации наблюдений над растениями, – “политению” [4, 20], или “полинемию” [5, с. 167]. Политенные (полинемные) хромосомы из слюнных желез насекомых сыграли беспрецедентную роль в развитии цитогенетики: они позволили на световых микроскопах исследовать такие события, как дупликации, делеции, инверсии, транслокации участков хромосомы. Наблюдения за образованием утолщений (пуфов), появляющихся в онтогенезе то на одних, то на других участках политенных хромосом, легли в основу генетики развития [5, 8, 18, 28 и мн. др.].

Гигантские хромосомы еще в конце XIX в. описал Э. Бальбиани [4]. В каждой из политенных хромосом число молекул ДНК может превышать тысячу [4]. При делениях загодя созданные копии ДНК распределяются по хромосомам дочерних клеток, минуя синтез новых молекул. Политенные состояния присущи привычным для нас митотическим и мейотическим циклам. Перед делениями, в постсинтетический период G_2 , каждая молекула ДНК состоит из двух хромонем [5, 8, 18, 28, 37].

Диплоидная $2n$ материнская клетка макроспор (археспора) делится с образованием линейной тетрады гаплоидных $1n$ гамет (макроспор). Линейка макроспор закладывает ось будущего макрогаметофита. Одна из макроспор (функциональная), расположенная на халазальном конце линейки, получает в наследство весь материнский митохондрий и продолжает рост, остальные, лишенные митохондрий, деградируют [30, с. 66–68]. У некоторых видов и особей после первого деления микропилярная клетка не завершает мейоз, и образуется триада макроспор [30, 34 и др.].

Функциональная макроспора (гамета) длительное время не делится и увеличивается в размерах. Предположительно в этот период она синтезирует запас политенных (полинемных) копий молекул ДНК. Последующие деления при образовании макрогаметофита сопровождаются только распределением наработанных копий молекулы (нитей), без синтеза новой ДНК. Необходимость создания предварительного резерва строительных материалов для дальнейшего автономного развития в значительной мере определяется формированием спородермы, внутренней оболочки макроспоры [30], лишенной плазмодесм и практически полностью изолирующей макрогаметофит от общения с окружающими тканями спорофита.

Геном яйцеклеток, созревающих в архегониях, представлен гаплоидным 32-копийным набором ДНК [3, 9, 50]. Экстраполируя линию наращи-

вания числа копий ДНК назад, до хромосом функциональной макроспоры, мы видим, что ее ядра могут содержать $2048 = 2^{11}$ нити хромонем (11 циклов удвоения молекулы). Автоматизм и кордебалетная слаженность симультативных делений ядер ценоцитного макрогаметофита [30, 34, 37, 44, 53, 54 и др.] поддерживают эту гипотезу. В однолетнем ценоцитном макрогаметофите сосны обыкновенной макроспора дробится на 32 ядра и в таком виде зимует. В 2-летнем женском гаметофите *Pinus strobus* L. ~2000 ядер [44]. Примерно такое же число ядер насчитывается и в макрогаметофитах других сосен к моменту перехода к целлюлярному строению [34].

В 32-ядерном состоянии ядра ценоцитных макрогаметофитов сосны имеют 64-кратный уровень политении. На втором году развития макрогаметофита редукция политении продолжается. Отдельные клетки в микропилярной зоне гаметофита не делятся и становятся позднее инициалами архегониев, остальные клетки продолжают делиться, редуцируя уровень политении до однокопийного. После деления центральной клетки архегония дочерняя халазальная клетка становится яйцеклеткой и получает по 32 копии каждой молекулы ДНК, микропилярная клетка становится брюшной канальцевой клеткой.

Если хотя бы одна из хромосом в геноме матери по тем или иным причинам неспособна синтезировать 2048 копий молекулы ДНК, половина гаметофитов не сможет завершить свободоядерную стадию развития. Половина семян погибнет, что мы и наблюдаем у высокочереззерных сосен.

Изложенная схема противоречит оценкам изменений содержания ДНК в процессе созревания яйцеклетки, полученным И.П. Ермаковым с соавт. [3, 9]. По их представлениям 32-копийная политения возникает заново в процессе синтеза ДНК в расширяющемся ядре яйцеклетки. Мы, однако, считаем, что изменения в интенсивности связывания красителя, акридинового оранжевого, определяющие интенсивность флуоресценции хроматина, по которой оценивали концентрацию ДНК, так же как и изменения объема яйцеклетки и ее ядра, скорее всего, вызваны прогрессирующей деспирализацией молекул ДНК перед оплодотворением, а не синтезом ДНК.

Вероятно, политения – необходимый атрибут раннего эмбриогенеза растений и животных [3, 5, 9, 19, 20]. Многокопийные варианты позволяют надежнее защищать информационные молекулы от мутационных повреждений.

Интересно отметить, как начинается дифференциация зародышей при соматическом эм-

бриогенезе в культуре тканей [32]. Для инициации эмбриогенеза в каллусной культуре должны появиться особые клетки – “трубки” длиной 200 мкм (нормальные клетки изодиаметричны ~20 мкм). Только после асимметричного деления клеток-трубок мелкоклеточный пояс начинает делиться и формировать эмбриональную массу, из которой при соответствующей последовательности пассажей культуры на разные питательные среды дифференцируются проростки. По Д. Мэзия асимметричные деления свидетельствуют о политении материнской клетки [20]. С этой точки зрения появление клеток с политенным геномом в культуре тканей так же необходимо для старта эмбриогенеза, как в естественных условиях необходима 32-кратная политения яйцеклетки.

Дополнительная причина нарушений, выражающихся в преждевременной гибели макрогаметофитов и образовании мелких недоразвитых семян, – мутационные повреждения макроспор и макроспор в период мейоза [23]. Чувствительность мейоза к мутагенам во много раз выше, чем митоза и на несколько порядков выше чувствительности покоящихся стадий [23, 35, 36, 55]. В зоне аварии 1986 г. на ЧАЭС, в случае, когда мейоз проходил на фоне облучения ~ 20 рад, череззерница шишек резко возросла спустя год в урожае 1987–1988 г. [23, 35, 36]. В относительно малой степени увеличилась эмбриональная смертность и выражающая ее пустосемянность в урожае 1986–1987 гг. [23]. Гибель семян от радиоактивного излучения имитировала естественный процесс образования недоразвитых семян у высокочереззерных особей. Первичные мутационные повреждения ДНК послужили, очевидно, препятствием для завершения синтеза политенных копий молекулы в пострадавших макроспорах.

Отметим кажущуюся несоразмерность частот мутаций и недоразвития семян. Частота мутаций 10^{-5} – 10^{-9} , а частота мелких семян 10^{-1} – 10^{-2} . Данная оценка вероятности мутационных событий, однако, касается только мономорфных генов. Частоты мутаций полиморфных генов достигают 10^{-3} – 10^{-5} [2, 25]. Частота вторичных мутаций, возникающих вследствие репарации первичных повреждений генома, еще выше – 10^{-2} – 10^{-3} [2, 8, 10, 25 и мн. др.]. Частота сбоев синтеза политенных копий молекулы ДНК зависит от суммы нерепарированных нарушений, накопленных гаплотипами гамет или геномами зародышей в совокупности “компетентных” генов. Нехватка политенных копий ДНК хотя бы в одной хромосоме прекращает развитие женского гаметофита, точно

так же, как это происходит у высокочереззерных сосен в интактных древостоях.

Межвидовая несовместимость у хвойных определяется иными механизмами. При внутривидовых скрещиваниях развитие женского и мужского гаметофитов проходит в режиме диалога, когда последовательное выделение химических сигналов (ингибиторов или стимуляторов) останавливает или запускает определенные фазы онтогенеза семязачки. Любое несоответствие в ритме этих сигналов у разных видов приводит к сбою и остановке всего процесса [34]. Не исключена видовая специфика самих сигнальных веществ [47]. Однако принцип реализации несовместимости в этом случае иной. Если на внутривидовом уровне микрогаметофит или зародыш, чтобы успешно работать, должны распознать объект (у хвойных – ткани макрогаметофита) как чужой, то при межвидовой несовместимости половой процесс, наоборот, не срабатывает с заведомо чужим, “слишком чужим” объектом, не синхронизировавшим взаимодействия микро- и макрогаметофитов, начиная с момента прорастания пыльцы.

Наиболее перспективными направлениями дальнейших исследований эмбриогенеза хвойных нам представляются попытки определения содержания ДНК в клетках мужского и женского гаметофитов на разных фазах их развития [3, 9] и разработка иммунохимических тестов совместимости [21].

Выводы. 1. Теория полуплетального определения пустосемянности хвойных [49, 51] несостоятельна. Образование пустого семени определяется трофической несовместимостью клеток зародыша и эндосперма. 2. В неопитоплазму зиготы пластида привносятся пыльцевой трубкой микрогаметофита [29, 38]. Материнский “пластом” хвойных элиминируется из цитоплазмы клеток зародыша. 3. В популяциях сосны обыкновенной присутствуют деревья с двумя типами пластид. Трофическая совместимость определяется несовпадением типа пластид в цитоплазме зародыша и макрогаметофита. При несовпадении “пластотипов” зародыш воспринимает клетки эндосперма как чужие и успешно питается ими. Эффект трофической совместимости (распознавания “чужого”) достигается также при накоплении мутаций пластома. 4. Полное семя образуется при трофической совместимости зародыша (хотя бы одного из числа гетероэмбрионов) с клетками женского гаметофита (эндосперма). 5. Склонность высокочереззерных особей к образованию мелких недоразвитых семян определяется особенностями генома материнского дерева, неспособностью хотя бы

одной из хромосом синтезировать копии молекул ДНК в количестве, достаточном для прохождения свободной стадии развития макрогаметофита, и не связана с совместимостью поколений гаметофитов и спорофитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиева И.Б., Узбеков Р.Э. Чьи у человека центриоли? // Природа. 2012. № 5. С. 36–42.
2. Алтухов Ю.П., Духарев В.А., Животовский Л.А. Отбор против редких электрофоретических вариантов белка и темпы спонтанного мутационного процесса в популяциях // Генетика. 1983. Т. 19. № 2. С. 264–276.
3. Баранцева Л.М. Цитофизиологический анализ развития архегония *Pinus sibirica* Du Tour.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. М.: изд-во Моск. ун-та, 1992. 21 с.
4. Биологический энциклопедический словарь. Изд. 2-е, испр. М.: Советская энциклопедия, 1989. 864 с.
5. Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. 704 с.
6. Горожанкин И.Н. О корпскулах и половом процессе у голосеменных растений / Учен. зап. Моск. ун-та. Отд. естеств.-истор. 1880. Вып. 1. 174 с.
7. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Белоксинтезирующий аппарат и теория эндосимбиоза // Биология. М.: Мир, 1990. Т. 1. С. 285–287.
8. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. 488 с.
9. Ермаков И.П., Матвеева Н.П., Баранцева Л.М. Содержание ДНК в яйцеклетке *Pinus sibirica* Du Tour. на разных стадиях ее развития // Докл. АН СССР. 1980. Т. 251. № 1. С. 254–256.
10. Заварыкина Т.М. Структурные изменения ДНК при действии низкоинтенсивной ионизирующей радиации в малых дозах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.01. М., Ин-т биохим. физ., 2008. 26 с.
11. Ирошников А.И. Полиморфизм популяций кедров сибирского // Изменчивость древесных растений Сибири. Красноярск: СО АН СССР, 1974. С. 7–10.
12. Исаков Ю.Н., Кузнецова Н.Ф., Машкина О.С. Разнообразие по уровню самофертильности и его генотипическая обусловленность у сосны обыкновенной // Лесоведение. 2000. № 2. С. 44–50.
13. Ковалев А.Г. Формирование структуры ассимилирующих органов деревьев хвойных пород // Рост и газообмен CO₂ у лесных деревьев. М.: Наука, 1993. С. 5–16.
14. Козубов Г.М. Биология плодоношения хвойных на Севере. Л.: Наука, 1974. 133 с.
15. Котелова Н.В., Хромова Л.В. К вопросу об опылении и росте пыльцевых трубок при ксеногамии //

- Научные труды Московск. лесотех. ин-та, 1974. Вып. 51. С. 44–50.
16. Кузнецова Н.Ф. Развитие мужского гаметофита сосны обыкновенной при самоопылении и свободном опылении // Лесоведение. 1991. № 3. С. 27–33.
 17. Кузнецова Н.Ф. Чувствительность генеративной сферы сосны обыкновенной к засухе // Лесоведение. 2010. № 6. С. 46–53.
 18. Лобашев М.Е., Ватти К.В., Тихомирова М.М. Нехромосомное (цитоплазматическое) наследование // Генетика с основами селекции. М.: Просвещение, 1979. С. 167–187.
 19. Мазунин И.О., Володько Н.В. Митохондрии: жизнь в клетке и ее последствия // Природа. 2010. № 10. С. 3–14.
 20. Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления / Пер. с англ. М.: Изд-во Иностран. литер., 1963. 430 с.
 21. Новожилова О.А., Гринаш М.Н., Арефьева Л.П., Семихов В.Ф. Закономерности биосинтеза белков зародыша и эндосперма у *Pinus sylvestris* L. // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 2. С. 98–104.
 22. Пожидаева М.М., Исаков Ю.Н. Цитогенетика женско-стерильных форм сосны обыкновенной // Лесоведение. 1982. № 6. С. 84–89.
 23. Романовский М.Г. Формирование урожая семян сосны обыкновенной в норме и при мутагенном загрязнении. М.: Наука, 1997. 112 с.
 24. Романовский М.Г. Гаметогенез и эмбриогенез сосны обыкновенной. Гипотезы и мифы // Научные труды Моск. гос. ун-та леса, 1999. Вып. 297. С. 23–28.
 25. Романовский М.Г., Рябоконь С.М. Гетерозиготность особи как мутагенный фактор // Генетика. 1992. Т. 28. № 12. С. 88–97.
 26. Романовский М.Г., Рябоконь С.М., Хромова Л.В. Рост и опад семян сосны обыкновенной // Лесоведение. 1991. № 4. С. 80–88.
 27. Романовский М.Г., Рябоконь С.М., Митроченко В.В., Шлончак Г.А., Шлончак А.В. Наследование уровня череззерницы шишек у сосны обыкновенной // Генетика. 1991. Т. 27. № 9. С. 1668–1672.
 28. Стент Г., Келиндар Р. Молекулярная генетика / (Пер. с англ.) М.: Мир, 1961. 646 с.
 29. Тренин В.В. Электронно-микроскопическое изучение развития архегония лиственницы // Цитология и генетика. 1984. № 3. С. 167–173.
 30. Тренин В.В. Введение в цитоэмбриологию хвойных. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1988. 152 с.
 31. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1990. 157 с.
 32. Третьякова И.Н., Ижболдина М.В. Индукция соматического эмбриогенеза у кедрового сибирского // Лесоведение. 2009. № 5. С. 41–47.
 33. Френкель Р., Галун Э. Механизмы опыления, размножения и селекции растений. М.: Колос, 1982. 384 с.
 34. Хромова Л.В. Эмбриологические процессы при ксеногамии и межвидовых скрещиваниях у некоторых видов сосны из подрода *Diploxylon* Коehne. Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.03.01. Воронеж: Воронеж. лесотех. ин-т, 1986. 23 с.
 35. Хромова Л.В. Эмбриологические процессы у сосны обыкновенной в семяпочках второго года после острого облучения в год опыления в районе ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 5. С. 505–513.
 36. Хромова Л.В., Романовский М.Г., Духарев В.А. Частичная стерильность сосны в 1986 и 1987 гг. в зоне аварии на ЧАЭС // Радиобиология. 1990. Т. 30. Вып. 4. С. 450–457.
 37. Царев А.П., Погиба С.П., Тренин В.В. Основы эмбриологии древесных растений // Генетика лесных древесных пород. Изд. 2-е, испр. М.: Моск. гос. ун-т. леса, 2001. С. 93–107.
 38. Camefort H. Un interpretation nouvelle de l'organisation du protoplasme de l'oosphere des pins // Travaux dedies a Lucien Plantefol. Paris, 1965. P. 407–436.
 39. Camefort H. Cytologie de la fecondation et de la proembryogenese chez quelques Gymnospermes // Bull. Soc. Bot. France. 1968. T. 115. N 3–6. P. 137–160.
 40. Camefort H. Fecondation et proembryogenese chez les Abietacees: Notion de neocytoplasme // Rev. Cytol. et Biol. Veg. 1969. V. 32. Fasc. 3–4. P. 253–271.
 41. Chamberlain C.J. Gymnosperms: structure and evolution. 3 ed. Chicago, 1966. 484 p.
 42. Dogra P.D. Seed sterility and disturbances of embriogeny in Conifers // Stud. For. Suec. 1967. V. 45. P. 1–97.
 43. Doyle J. Proembryogeny in *Pinus* in relation to that in other conifers – a survey // Proc. Roy. Dublin Soc. 1963. V. 62. Sect. Biol. P. 161–216.
 44. Ferguson M.C. Contributions to the knowledge of the life history of *Pinus* with special reference to sporogenesis, the development of the gametophytes and fertilization / Proc. Washington Acad. Sci. 1904. N 6. 202 p.
 45. Gianordoli M. Ultrastructure des spermatozoids de trios Gymnospermes: *Cephalotaxus drupacea*, *Sciadopitys verticillata*, *Taxus baccata* // C. r. Acad. Sci. 1974. D. 278. N 21. P. 2637–2640.
 46. Griffin A.R., Lindgren D. Effects of inbreeding on production of filled seeds in *Pinus radiata* – experimental results and model of gene action // Theor. and Appl. Genet. 1985. V. 71. N 2. P. 334–343.
 47. Hagman M. Incompatibility in forest trees // Proc. Roy. Soc. London (B. Biol. Sci.). 1975. V. 188. N 1092. P. 313–313.
 48. Hamrick J.L., Schnabel A. Understanding the genetic structure of plant population, some old problems

- and new approach // Population genetics in forestry. Proceedings of UIFRO working party "Ecological and population genetics" 21–24 aug. 1984. Gettingen. Lecture notes in biomathematics. V. 60. Berlin: Springer, 1985. P. 50–70.
49. *Koski V.* Embryonic lethals and empty seeds in *Picea abies* and *Pinus sylvestris* // Comm. Inst. For. Fenn. 1971. V. 75. N 3. P. 1–30.
50. *Nagle W.* Karyologische Anatomie der Samenanlagen von *Pinus sylvestris* // Osterr. Bot. Zeitschrift. 1967. V. 112. P. 349–370.
51. *Namkoong G., Bishir J.* The frequency of lethal alleles in forest tree populations // Evolution. 1987. V. 41. N 5. P. 1123–1127.
52. *Sarvas R.* Investigation on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris* // Comm. Inst. For. Fenn. 1962. V. 53. N 4. P. 1–198.
53. *Schnarf K.* Embriologia der Gymnospermen. Handbuch der Pflanzenanatomie. Abt. 2. Bd. 2. Berlin: Verl. B.K. Linsbauer, 1933. 400 s.
54. *Singh H.* Embriology of Gymnosperms. Berlin – Stuttgart: Borntraeger, 1978. 302 p.
55. *Sparrow A.H., Woodwell G.M.* Prediction on the sensitivity of plants to chronic gamma irradiation // Radiat. Bot. 1962. V. 2. N 1. P. 9–26.
56. *Takaso T., Owens J.N.* Effects of ovular secretion on pollen in *Pseudotsug mensiensii* (Pinaceae) // Amer. J. Bot. 1994. V. 81. N 4. P. 504–513.
57. *Wilkie D.* Incompatibility in Bracken // Heredity. 1956. V. 10. Pt 2. P. 247–256.
58. *Willemse M.T.M.* Megagametogenesis and formation of neocytoplasm in *Pinus sylvestris* L. // Fertilization in higher plants. Amsterdam-Oxford: North Holland, 1974. P. 97–102.

Compatibility of Tissues in Embryogenesis of Pine

M. G. Romanovsky, L. V. Khromova

The intraspecies compatibility of cells in different individuals and generations is one of the old-age problems in sexual reproduction. In conifers, we observe an inheritance of ferns that is the compatibility due to the interaction between embryo and female gametophyte. Incompatibility of germs and endosperms causes death of embryos and an appearance of empty seeds. Germ receives only paternal plastids. Before fertilization, maternal plastids of ovum estrange themselves in Hofmeister bodies. Two types of plastids are present in Scotch pine populations. As paternal and maternal plastids do not coincide, a germ is compatible with endosperm. Death of female gametophytes of the second year before fertilization, which leads to the formation of abortive seeds, is not related to the intraspecies compatibility. A half of the gametes in half-sterile-coned pine trees do not synthesize copies of DNA molecules in the amount sufficient to accomplish the "distributional" cenocyte stage of the megagametophyte development. Because of the insufficient polyteny level in one of the chromosomes in the haplotype of a functional macrospore, megagametophyte dies, its development being incomplete. Polyteny is preserved in proembryo cells of conifers. In tissue culture, somatic embryogenesis begins with the formation of large, probably, polytene cell-tubes.

Scotch pine, cross compatibility, empty seeds, abortive seeds.