

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА РАЗМЕРЫ И СКУЛЬПТУРУ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН PINUS SYLVESTRIS L. И QUERCUS DENTATA THUNB

Евстигнеева Т.А., Нарышкина Н.Н.

*Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток, e-mail: melnikova@ibss.dvo.ru*

Изучено влияние различных способов химической обработки на размеры и скульптуру пыльцевых зерен *Pinus sylvestris* L. и *Quercus dentata* Thunb. Установлено, что воздействие щелочью является наиболее подходящим для проведения морфологических исследований пыльцевых зерен в световом микроскопе: для *P. sylvestris* воздействие 10% раствором NaOH в течение 60 минут или 15% – в течение 30 минут; для *Q. dentata* воздействие 10% раствором щелочи в течение 120 минут или 15% – в течение 40 минут. Наибольшие значения размеров исследуемой пыльцы были получены после их обработки щелочью. При изучении в сканирующем электронном микроскопе выявлено, что тип скульптуры пыльцевых зерен *Pinus sylvestris* и *Quercus dentata* не меняется в зависимости от способов химической обработки. При воздействии 50% раствором серной кислоты на пыльцевые зерна *Quercus dentata* хорошо различима скульптура бороздной мембраны.

Ключевые слова: химическая обработка, пыльцевые зерна, *Pinus sylvestris*, *Quercus dentata*

INFLUENCE OF CHEMICAL PROCESSING ON SIZE AND SCULPTURE OF POLLEN GRAINS OF PINUS SYLVESTRIS L. AND QUERCUS DENTATA THUNB

Evstigneeva T.A., Naryshkina N.N.

*Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch Russian Academy of Science,
Vladivostok, e-mail: melnikova@ibss.dvo.ru*

Influence of chemical processing on size and sculpture of pollen grains of *Pinus sylvestris* L. and *Quercus dentata* Thunb. has been studied. It is established that influence by alkali is the most suitable for carrying out morphological researches of pollen grains in a light microscope: for *P. sylvestris* influence of 10% by NaOH solution within 60 minutes or 15% – within 30 minutes; for *Q. dentata* influence of 10% by alkali solution within 120 minutes or 15% – within 40 minutes. The greatest values of the sizes of studied pollen were received after their processing by alkali. Using a scanning electronic microscope it is revealed that the type of a sculpture of pollen *Pinus sylvestris* and *Quercus dentata* grains doesn't change depending on chemical processing. Sculpture of a apertural membrane of pollen grains of *Quercus dentata* is well distinguishable after influence of 50% by solution of sulfuric acid

Keywords: chemical processing, pollen grains, *Pinus sylvestris*, *Quercus dentata*

Изучение эталонных препаратов современной пыльцы и спор для выявления критериев их видовой диагностики имеет большое значение как для решения вопросов систематики отдельных таксонов, так и при спорово-пыльцевом анализе кайнозойских отложений. Обычно рецентную пыльцу обрабатывают ацетолизной смесью (9 частей уксусного ангидрида и 1 часть серной кислоты) в течение 3 минут. Это позволяет достичь ее сходства с ископаемыми пыльцевыми зёрнами. Однако не всегда использование этой методики приводит к желаемым результатам. Кроме того, в последнее время весьма затруднительно стало приобретение уксусного ангидрида, необходимого для приготовления ацетолизной смеси. По этой причине очень важны экспериментальные исследования, направленные на поиск таких методик, при применении которых обработанная пыльца имела бы как можно меньше повреждений, и элементы ее строения были доступны для изучения. **Целью** настоящего исследования было установить альтернативный и наиболее эффективный

способ химической обработки пыльцевых зерен, на примере рецентной пыльцы *Pinus sylvestris* и *Quercus dentata*.

Материал и методы исследований

Материалом для исследования послужила современная пыльца *Pinus sylvestris* и *Quercus dentata*. Обработка пыльцевых зерен производилась с использованием ацетолизной смеси, 50% раствора серной кислоты и 10 и 15% раствора щелочи. В ходе эксперимента менялась продолжительность воздействия растворов на пыльцу при нагревании смеси на водяной бане (табл. 1). Затем обработанная пыльца отмывалась до тех пор, пока среда не становилась нейтральной. Дальнейшее исследование пыльцы осуществлялось с использованием светового (Axioskop 40, Carl Zeiss) и сканирующего электронного (EVO 40, Carl Zeiss) микроскопов. При просмотре препаратов в световом микроскопе в качестве среды использовался глицерин.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе эксперимента было установлено, что для проведения морфологических исследований пыльцевых зерен *P. sylvestris* в световом микроскопе наиболее оптимальным оказалось воздействие щелочью,

а именно: 10% раствором NaOH в течение 60 мин и 15% – в течение 30 мин. Обработка пыльцы таким способом позволяет проводить измерения и хорошо различать элементы строения зерен. Менее благоприятной оказалась химическая обработка пыльцевых зерен ацетолизной смесью

и 50% раствором серной кислоты, вне зависимости от продолжительности воздействия растворов. В результате во всех исследуемых препаратах содержался большой процент деформированной (смятой) пыльцы с неясно выявляемой скульптурой щита и ячей мешков.

Таблица 1

Способы химической обработки пыльцы исследуемых в эксперименте видов

Химический раствор	Pinus sylvestris				Quercus dentata							
	Время воздействия (мин)											
10% раствор NaOH	5	10	30	60	12	40	60	80	120			
15% раствор NaOH	20		30	40	40	60		80				
50% раствор серной кислоты	5		10	30	5	10		30				
Ацетолизная смесь	3	5	7	10	12	15	3	5	7	10	12	15

В табл. 2 приведены измерения основных параметров пыльцевых зерен *Pinus sylvestris* в зависимости от химической обработки. Наибольшие значения размеров пыльцы были получены после их обработки 15% раствором щелочи в течение 30 мин,

а наименьшие – обработанные ацетолизной смесью и 50% раствором серной кислоты. Причем размеры пыльцевых зерен после воздействия 15% раствором щелочи близки к размерам пыльцы, не подвергшейся химической обработке.

Таблица 2

Изменения основных параметров пыльцы *Pinus sylvestris*

Химическая обработка (время воздействия)	Высота тела, мкм	Ширина тела, мкм	Длина тела, мкм	Длина пыльцевого зерна, мкм
	Средние значения (диапазон изменения размеров)			
10% раствор щелочи (60 мин)	43,45 (41,25–46,75)	45,9 (41,25–49,5)	51,56 (46,75–55,0)	78,24 (68,75–85,25)
15% раствор щелочи (30 мин)	42,35 (38,5–46,75)	48,13 (44,0–52,25)	52,94 (46,76–60,5)	78,5 (70,13–85,25)
50% раствор серной кислоты (10 мин)	35,55 (33,0–41,25)	43,04 (33,0–46,75)	47,04 (41,25–53,63)	74,54 (68,75–85,25)
Ацетолизная смесь (5 мин)	–	42,63 (33,0–46,75)	46,75 (41,25–52,25)	78,15 (71,5–88,0)
Без обработки	–	46,89 (44,0–50,88)	49,78 (46,75–52,25)	77,89 (72,88–85,25)

Изучение пыльцы *Q. dentata* показало следующие результаты. После обработки зерен 10% раствором щелочи в течение 120 мин они приобретают желто-зеленую окраску, имеют правильную эллипсоидальную форму, округлотрехлопастные очертания, хорошо различимые элементы строения поверхности, видна ее зернистость и столбиковая структура. После обработки 15% раствором щелочи в течение 40 мин оболочка пыльцевых зерен становится более окрашенной, что дает возможность детально рассмотреть ее строение. Химическая обработка зерен 50% раствором серной кислоты и воздействие ацетолизной смесью более 7 минут оказались менее подходящими. В препаратах содержалось большое

количество смятых и разорванных пыльцевых зерен с неясно просматриваемыми элементами строения оболочки. Наибольшие размеры экваториального диаметра наблюдались у пыльцы после обработки 10% раствором щелочи в течение 120 мин, а наименьшие – обработанной ацетолизной смесью в течение 5 минут (табл. 3). Наибольшая толщина экзины (1,67 мкм) наблюдался у зерен, обработанных ацетолизной смесью, а наименьшая (1,52 мкм) – после воздействия серной кислотой.

Л.А. Куприянова [2], изучая морфологию современной пыльцы однодольных, отмечала, что обработанные щелочью пыльцевые зерна оказались более крупными, чем после воздействия ацетолизной смесью. Хотя, по

мнению М.Х. Монозон [3], изучавшей морфологию пыльцы семейства Chenopodiaceae, размеры пыльцевых зерен, в зависимости от различных методик обработки, существенно не изменяются. Однако большинство иссле-

дователей, при изучении морфологических признаков пыльцы приходят к выводу, что размеры зерен, обработанных ацетолизной смесью, превосходят размеры пыльцы после воздействия щелочью [1, 4, 5, 6].

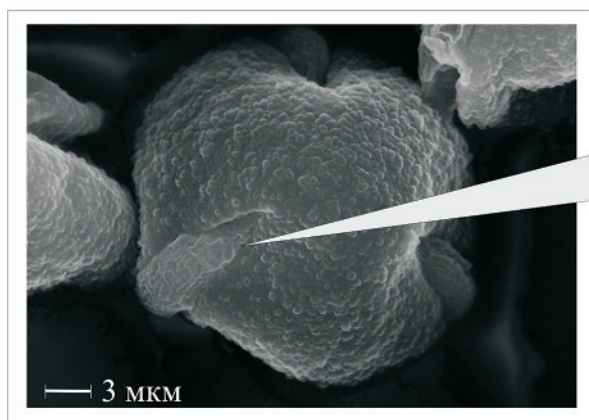
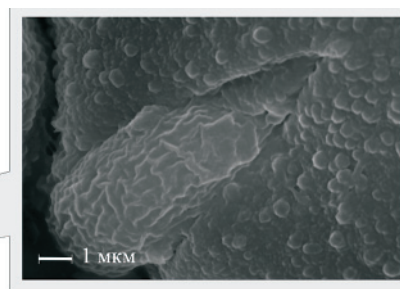
Таблица 3

Изменения основных параметров пыльцы *Quercus dentata*

Химическая обработка (время воздействия)	Экваториальный диаметр, мкм	Диаметр аппо- кольпиума, мкм	Толщина внешней оболочки зерна, мкм
	Средние значения (диапазон изменения размеров)		
10% раствор щелочи (120 мин)	36,8 (33,45–39,6)	17,35 (11,4–21,75)	1,5 (1,2–2,25)
15% раствор щелочи (40 мин)	29,73 (26,85–32,4)	10,83 (8,4–12,9)	1,49 (1,2–1,95)
50% раствор серной кислоты (10 мин)	29,21 (25,5–34,05)	14,01 (12,0–19,36)	1,52 (1,2–2,35)
Ацетолизная смесь (5 мин)	28,11 (25,5–29,7)	8,01 (5,7–10,05)	1,67 (1,35–2,1)
Без обработки	33,41 (32,25–34,5)	–	–

В результате изучения исследуемых в эксперименте видов с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) было выявлено, что в целом тип скульптуры пыльцевых зерен *P. sylvestris* и *Q. dentata* не меняется в зависимости от

применяемых способов химической обработки. Тем не менее, при воздействии 50% раствором серной кислоты на пыльцевые зерна *Quercus dentata* становится хорошо различима скульптура бороздной мембраны.

Пыльцевое зерно *Quercus dentata*

Бороздная мембрана

Следует отметить, что некоторые исследователи присутствие определенного количества смятой пыльцы считают одним из показателей процесса гибридизации или полиплоидии, клейстогамии или апомиксиса, а также нарушением условий существования растений. Однако в результате нашего исследования выявлено, что пыльца, собранная из одного микростробила и обработанная разными способами, может быть как нормальной, так и деформированной.

Заключение

Проведенное экспериментальное исследование показало, что наиболее эффективным и альтернативным способом химической обработки пыльцы оказался щелочной: для *P. sylvestris* воздействие 10% раствором NaOH в течение 60 минут или 15% – в течение 30 минут; для *Q. dentata* воздействие 10% раствором щелочи в течение 120 минут или 15% – в течение 40 минут. После ее применения значительное количество

пыльцевых зерен имеют правильную форму и хорошо просматриваемые элементы строения их поверхности. Наибольшие значения размеров исследуемой пыльцы были получены также после их обработки щелочью. По всей вероятности, влияние способов химической обработки на пыльцу разных видов растений будет неодинаково. Это связано с тем, что строение и химический состав оболочек пыльцы различны, и, следовательно, они будут по-разному реагировать на воздействие определенных химических растворов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ и Президиума РАН (№ 12-05-31201 и 12-1-П28-01).

Список литературы

1. Губонина З.П. Описание пыльцы видов рода *Tilia* L., произрастающих на территории СССР // Тр. ин-та географии АН СССР. – 1952. – № 52. – С. 104–126.
2. Куприянова Л.А. Морфология пыльцы однодольных растений // Труды Ботан. ин-та АН СССР. Сер. 1. Флора и систематика растений. – 1948. – № 7. – С. 141–159.
3. Монозон М.Х. Морфология пыльцы семейства *Chenopodiaceae* Less // Тр. ин-та географии АН СССР. – 1951. – Вып. 50. – С. 142–166.
4. Сладков А.Н. Морфологическое описание пыльцы грушанковых, вертялицевых, вересковых, брусничных

и ворониковых европейской части СССР // Тр. ин-та географии АН СССР. – 1954. Вып. 11. – С. 139–151.

5. Федорова Р.В. Влияние методов обработки на величину пыльцевых зерен различных видов *Pinus* // Тр. ин-та географии АН СССР. – 1951. – Вып. 50. – С. 137–141.

6. Федорова Р.В. Некоторые особенности морфологии пыльцы культурных злаковых // Тр. ин-та географии АН СССР. – 1959. – Вып. 21. – С. 166–186.

References

1. Gubonina Z.P. Trudy in-ta geografii AN SSSR, 1952, no. 52, pp. 104–126.
2. Kupriyanova L.A. Trudy in-ta geografii AN SSSR, 1948, no. 7, pp. 141–159.
3. Monoszon M.X. Trudy in-ta geografii AN SSSR, 1951, no. 50, pp. 142–166.
4. Sladkov A.N. Trudy in-ta geografii AN SSSR, 1954, no. 11, pp. 139–151.
5. Fedorova R.V. Trudy in-ta geografii AN SSSR, 1951, no. 50, pp. 137–141.
6. Fedorova R.V. Trudy in-ta geografii AN SSSR, 1959, no. 21, pp. 166–186.

Рецензенты:

Маркевич В.С., д.г.-м.н., главный научный сотрудник лаборатории палеоботаники БПИ ДВО РАН, г. Владивосток;

Голов В.И., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории почвоведения и экологии почв БПИ ДВО РАН, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 07.03.2013.