

УДК 581.162.3

© С. М. Ковтун-Водяницька

СПОСІБ ПРОВЕДЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ З ВИЗНАЧЕННЯ ЯКОСТІ ПИЛКОВИХ ЗЕРЕН ВИДІВ РОДУ *NEPETA* L.

Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка НАН України
01014, м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1; e-mail: chanya-s@yandex.ru

Ковтун-Водяницька С. М. Спосіб проведення експерименту з визначення якості пилкових зерен видів роду *Nepeta* L. – Запропоновано спосіб визначення фертильності та життєздатності пилкових зерен видів роду *Nepeta* L. на штучному живильному середовищі. Проаналізовано пилок 28 зразків 15 видів і 1 форми. Шляхом експерименту підібрано оптимальний температурний режим та тривалість пророщування пилку, вивчено особливості перебігу процесу проростання. За результатами оцінювання якості пилку зроблено висновок про адаптивність інтродуцентів роду *Nepeta* до умов Правобережного Лісостепу України.

Ключові слова: види роду *Nepeta*, пилок, проростання, метод.

Вступ

Інтродукційна робота передбачає вивчення та оцінку рослинного об'єкту з позиції екологічної валентності до біотичних і абіотичних чинників. Ключовим свідченням успішності процесу є репродуктивна здатність рослин. На плодоношення запилюваних рослин має безпосередній вплив гармонійний розвиток репродуктивних органів [8-10, 21].

Пилкове зерно рослини (*granum pollinis*) є головним агентом запилення: це чоловічий гаметофіт, функція якого полягає в утворенні, зберіганні та транспортуванні генетичного матеріалу – чоловічих гамет до жіночої репродуктивної сфери. Результативність процесу запилення залежить від формування рослиною якісного пилку в достатній кількості, на що впливають умови зростання рослин, їх фізіологічний стан та вік, а також рівень популяційної мінливості, зумовлений спадковими ознаками [3, 4, 7].

На сьогодні дослідження пилку рослин є досить різноплановими з використанням різних методів: морфологічних, цитоембріологічних, сканінг-електронно-мікроскопічних, біохімічних та ін. У роботах вітчизняних та зарубіжних дослідників найбільш широко представлені результати досліджень морфологічної структури пилкових зерен рослин, якісні ж показники пилку при цьому розглядаються побіжно або взагалі не наводяться [13, 15-19, 23].

На даний час серед таксономічних груп маловивченими з палінологічної точки зору є представники роду *Nepeta* L. родини Lamiaceae Lindley [1, 14, 20, 24].

Види роду *Nepeta* на сьогодні є перспективними об'єктами інтродукційних досліджень насамперед як ефіроноси. Попри вміст в надземній частині рослин біологічно активних речовин для представників даного роду є властивим високий ступінь полімофізму в поєднанні з поліхімізмом, що дає розмаїтість форм і забезпечує широку палітру вихідного матеріалу для інтродукційно-селекційної роботи. Чимала кількість видів має медоносні властивості та декоративні ознаки. З огляду на широкий спектр використання представників роду *Nepeta* постає надзвичайно важливе питання їх насінного розмноження за умови інтродукції. В розрізі вивчення цього питання є важливим дослідження якості пилку інтродуцентів.

У результаті аналізу літературних інформативних джерел нами не виявлено відомостей стосовно якісних характеристик пилку видів роду *Nepeta*. Відсутність такого плану досліджень спонукало до розгляду даного питання у власних дослідженнях.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження виконано в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп) у 2011 р.

Мета роботи – визначити якісні характеристики пилкових зерен видів роду *Nepeta*.

Об'єкти дослідження – полікарпічні трав'янисті багаторічні види роду *Nepeta* різного географічного походження: 28 зразків 15 видів і 1 форми, інтродуковані в колекцію протягом

2006-2009 рр. Досліджено двостатеві квітки *Nepeta* у фазі статевого дозрівання з повністю розкритими нормальними функціональними пиляками. Експериментальним матеріалом слугував пилок живих рослин.

Якість пилку розглянуто з позиції його фертильності, стерильності і життєздатності з використанням непрямого та прямого методів дослідження. Фертильність визначено йодним методом, життєздатність – шляхом пророщування на штучному живильному середовищі [12, 22]. Оцінку якості пилку проведено згідно тривірневої шкали [11, 17].

Препарати вивчено під поляризаційно-інтерференційним мікроскопом «Biolar PI». Мікрозйомку виконано цифровою камерою eTREK DSM 520.

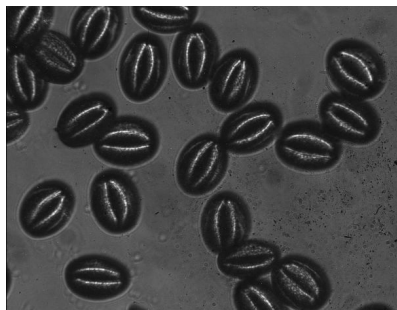
Систематичне положення дослідних видів наведено згідно із останньою систематичною обробкою роду *Nepeta* [2].

Експериментальні дані опрацьовано стандартними статистичними методами з використанням програми MS Excel 2010 [5-6].

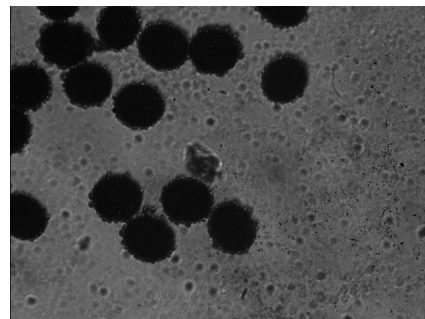
Результати та обговорення

Дослідження пилку в лабораторних умовах та встановлення його якісних характеристик з використанням непрямого та прямого методів дозволило оцінити ефективність процесу запилення у видів роду *Nepeta*, інтродукованих в Правобережному Лісостепу України.

Завдяки використанню йодного методу встановлено фертильність пилку інтродуцентів. Даний метод ґрунтується на зміні кольору крохмалю в пилкових зернах внаслідок йодної реакції (рис. 1). Відомо, що недорозвинені (стерильні) пилкові зерна мають неправильну форму, зморшкуваті, деформовані, тобто присутні очевидні ознаки недорозвинення і пошкодження, а також не містять крохмалю або містять лише його сліди. Тому після застосування методу спостерігали забарвлення фертильних пилкових зерен в темно-коричневий колір, а стерильних – у жовтий або ж вони взагалі лишалися незабарвленими.



a



b

Рис. 1. Пилкові зерна *Nepeta mussinii* Spreng. ex Henckel: a – загальний вигляд; b – під час визначення їх фертильності.

По закінченню дослідження фертильність пилку обраховано як співвідношення числа забарвлених зерен від загального числа зерен і подано у відсотках.

Шляхом пророщування пилку *in vitro* на предметному склі з нанесеним штучним живильним середовищем встановлено його життєздатність. Живильне середовище готували безпосередньо перед використанням. Для його приготування ми обрали найбільш прості складові, використані у такій пропорції: цукру – 2 г, желатину – 1 г, дистильованої води – 13 мл. Після нанесення пилкових зерен на живильне середовище, предметні скельця поміщали в чашки Петрі на вологий фільтрувальний папір. Потім чашки Петрі переносили до термостату з постійною температурою в 29°С.

Поняття життєздатності в проведених дослідженнях нами вжито більш вузько за традиційне, а саме: як опис проростання пилку. Життєздатними ми вважали пилкові зерна, довжина трубок яких перевищувала діаметр самого зерна. Під час дослідження підрахунки проведено в 10 полях зору.



Рис. 2. Проростання пилкових зерен *Nepeta mussinii* Spreng. ex Henckel.

Шляхом експерименту встановлено, що оптимальним для пророщування пилку рослин видів роду *Nepeta* є постійний температурний режим в межах 29-30°C. Зниження температури до 24-25°C викликало пониження життєздатності пилку в дослідних зразків на 5-19%.

З метою більш точного встановлення здатності пилку до запилення вивчали динаміку його проростання. Підрахунок пророслих пилкових зерен проводили через 1, 4 і 6 годин (рис. 3).

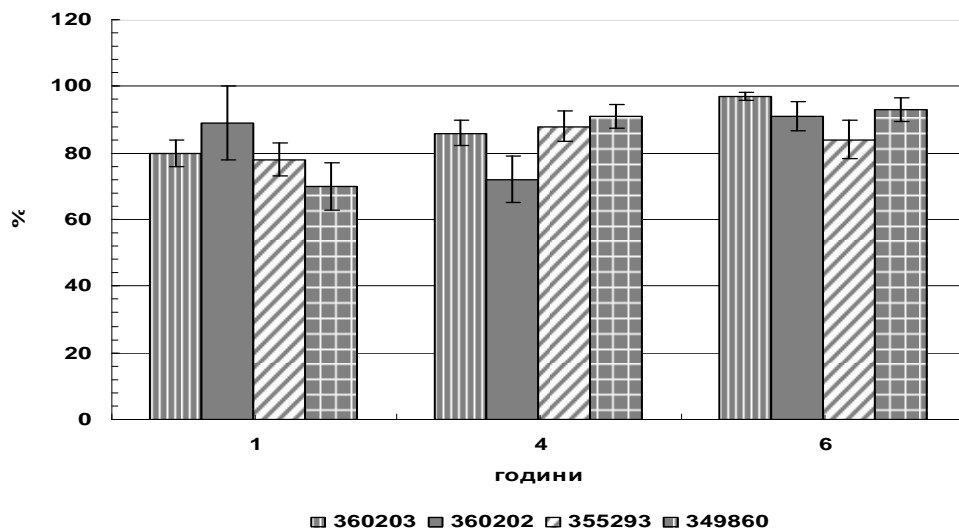


Рис. 3. Динаміка проростання пилку зразків *Nepeta grandiflora* Vieb. на живильному середовищі.

Встановлено, що початок проростання пилку в досліджених видів *Nepeta* спостерігався на 4-5 хвилині після нанесення на предметне скло з живильним середовищем. Процес проростання є достатньо динамічним. Оптимальна тривалість пророщування пилку складає 6 годин, після чого відбувався стрімкий лізис пилкових зерен.

Експерименти, проведені в лабораторних умовах, дозволили визначити та надати оцінку якісному стану життєздатності чоловічого гаметофіту рослин видів роду *Nepeta* у фазу масового цвітіння (табл. 1).

Відповідно до шкали оцінки якості пилку життєздатність менша за 30% вважається низькою, 31-70% – середньою, понад 70% – високою. За результатами оцінювання серед досліджених видів абсолютно неякісний пилок має *Nepeta nepetella*, середньої якості – *N. elliptica* L., решта дослідних видів продукують пилок високої якості.

Характеристика якості пилку видів роду *Nepeta* L., інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп)

| Назва секції, виду | Зразок | | Показники якості пилку | | | |
|---|----------------------|---|------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| | номер реєстрації | походження | фертильність, % | | життєздатність, % | |
| | | | M±m _M | V±m _V , % | M±m _M | V±m _V , % |
| <i>Macronepeta</i> Benth. | | | | | | |
| <i>Nepeta sibirica</i> L. | 360210 | Росія, Республіка Хакасія, м. Абакан | 95,1±1,24 | 4,1±0,9 | 88,4±3,6 | 12,9±2,9 |
| | 360209 | Україна, м. Львів | 74,7±6,2 | 26,4±5,9 | 64,7±7,66 | 37,4±8,4 |
| | 355297 | Польща, м. Вроцлав | 98,2±1,7 | 5,5±1,2 | 92,2±4,09 | 14,1±3,1 |
| <i>Spicatae</i> (Benth.) Pojark. | | | | | | |
| <i>N. elliptica</i> L. | 347265 | Польща, м. Вроцлав | 89,4±3,6 | 12,9±2,9 | 69,7±5,8 | 26,6±5,9 |
| <i>N. laevigata</i> (D.Don) Handel- Mazzetti | 349061 | Польща, м. Вроцлав | 90,3±2,3 | 8,1±1,8 | 85,0±5,01 | 18,9±4,2 |
| <i>N. royleana</i> R. R. Stewart | 360208 | Україна. м. Львів | 96,4±1,9 | 6,3±1,4 | 91,6±4,2 | 14,4±3,2 |
| <i>Sparhonepeta</i> (Briq.) Rech. | | | | | | |
| <i>N. distans</i> Royle ex Benth. | 349976 | Німеччина, м. Байройт | 99,2±0,8 | 0,80±0,6 | 92,4±2,3 | 7,8±1,7 |
| <i>Macrostegiae</i> (Boiss.) Rech. | | | | | | |
| <i>N. sibthorpii</i> Benth. | 394207 | Швейцарія, м. Женева | 95,6±2,0 | 6,6±1,5 | 77,7±7,2 | 29,4±6,6 |
| <i>N. parnassica</i> Heldr. et Sart. | 348721 | Великобританія, м. Віслі | 91,4±5,2 | 18,1±4,1 | 81,4±5,3 | 20,5±4,6 |
| <i>Orthonepeta</i> Benth. | | | | | | |
| <i>N. nuda</i> L. | 355295 | Польща, м. Вроцлав | 95,2±1,6 | 5,2±1,2 | 87,6±4,3 | 15,7±3,5 |
| <i>Nepeta</i> | | | | | | |
| <i>N. cataria</i> L. | 360214 | Україна, с. Березоточа | 97,7±0,8 | 2,6±0,6 | 86,3±4,1 | 15,02±3,4 |
| | 360213 | Україна, м. Нова Каховка | 83,2±3,4 | 13,08±3,0 | 87,4±3,1 | 11,2±2,5 |
| | с. Кентавр 361997 | Росія, м. Москва | 96,9±1,1 | 3,4±0,8 | 88,2±3,7 | 13,4±3,0 |
| <i>N. cataria</i> var. <i>citriodora</i> Dum. | 360216 | Україна, м. Дніпропет- ровськ | 88,7±2,8 | 10,1±2,3 | 87,9±5,2 | 18,7±4,2 |
| <i>N. grandiflora</i> Bieb. | 360203 | Україна, м. Київ | 98,8±0,4 | 1,4±0,3 | 96,8±1,2 | 3,8±0,9 |
| | 360202 | Росія, м. Москва | 92,4±2,8 | 9,6±2,3 | 91,2±4,3 | 14,7±3,3 |
| | 355293 | Польща, м. Вроцлав | 97,4±1,3 | 4,1±0,9 | 88,4±4,4 | 15,7±3,5 |
| | 349860 | Бельгія, м. Мейс | 97,9±1,2 | 3,8±0,8 | 93,0±3,6 | 12,2±2,7 |

| Назва секції, виду | Зразок | | Показники якості пилку | | | |
|---|---------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| | номер реєстрації | походження | фертильність, % | | життєздатність, % | |
| | | | M±m _M | V±m _V , % | M±m _M | V±m _V , % |
| <i>N. mussinii</i> Spreng. ex Henckel | 360206 | Україна, м. Дніпропет- ровськ | 97,7±1,7 | 1,7±1,2 | 84,4±5,4 | 20,1±4,5 |
| | 349123 | Італія, м. Когне | 93,9±1,8 | 6,0±1,3 | 85,9±4,7 | 17,4±3,9 |
| | 352770 | Італія, м. Курмайор | 97,5±1,0 | 3,1±0,7 | 86,0±4,1 | 15,2±3,4 |
| | 349801 | Чехія, м. Брно | 95,4±2,1 | 6,97±1,56 | 85,7±5,0 | 18,5±4,1 |
| | 360207 | Україна, с. Березоточа | 96,8±2,0 | 6,5±1,5 | 89,0±3,8 | 13,5±3,0 |
| <i>N. transcaucasica</i> Grossh. | 360205 | Україна, с. Березоточа | 82,1±6,6 | 25,5±5,7 | 89,1±3,8 | 13,9±3,0 |
| | 360204 | Україна, м. Прилуки | 98,3±0,8 | 2,5±0,6 | 88,7±3,6 | 12,9±2,9 |
| <i>N. nepetella</i> L. | 352771 | Італія, м. Курмайор | < 0,2 | - | - | - |
| <i>N. racemosa</i> Lam. cv. Benth Chatto | 346866 | Чехія, м. Пльзень | 96,6±1,4 | 4,5±1,0 | 82,4±3,4 | 13,±2,9 |
| <i>Shizocalyx</i> (Boiss.) Pojark. | | | | | | |
| <i>N. melissae- folia</i> Lam. | 351671 | Польща, м. Вроцлав | 74,2±3,4 | 14,3±3,2 | 74,4±6,3 | 26,7±6,0 |

Висновки

У результаті проведених досліджень з визначення якості пилкових зерен видів роду *Nepeta*, інтродукованих у Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України, встановлено, що в переважній більшості дослідних зразків домінує показник високої фертильності та життєздатності пилкових зерен. Високі показники є підтвердженням загальної стабільності інтродуцентів при зростанні в умовах Правобережного Лісостепу.

Рекомендуємо в дослідженнях з встановлення якісних показників пилкових зерен представників роду *Nepeta* дотримуватися таких умов проведення експерименту: постійний температурний режим 29-30 С, підрахунок життєздатності пилку після 6 годин пророщування в чашках Петрі, спостереження динаміки проростання від першої години тривалості експерименту.

Список літератури

1. Аксенов Ю. В. Морфологические особенности пыльцы видов рода *Nepeta* L., интродуцированных в Никитском ботаническом саду / Ю. В. Аксенов, В. Д. Работягов, С. А. Дроботов // Вісті Біосферного заповідника «Асканія-Нова». – 2004. – Т. 6. – С. 63–67.
2. Буданцев А. Л. Конспект рода *Nepeta* L. (Lamiaceae) / А. Л. Буданцев // Бот. журн. – 1993. – Т. 78, № 1. – С. 93–107.
3. Годин И. Н. Изменчивость морфологических признаков пыльцевых зерен и фертильности пыльцы в ценопопуляциях *Pentaphylloides fruticosa* (Rosaceae) Алтае-Саянской горной области / И. Н. Годин // Растительный мир Азиатской России. – Новосибирск, 2008. – № 2. – С. 47–53.
4. Демьянова Е. И. К антокологии и семенной продуктивности трех видов многоколосника (*Agastache* Claut. ex Gronov.) в условиях интродукции в Приуралье / Е. И. Демьянова, С. А. Шумихин, М. М. Дубровских // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о земле. – 2011. – Вып. 2, сер. 6. – С. 61–65.

5. Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г. Н. Зайцев. – М., 1984. – 424 с.
6. Зайцев Г. Н. Математический анализ биологических данных / Г. Н. Зайцев. – М., 1991. – 184 с.
7. Лан М. З. Влияние температуры и длины дня на фертильность пыльцы у чувствительной к фотопериоду формы риса *indica* с мужской стерильностью / М. З. Лан, Л. Ж. Ден, Л. Б. Чен // Физиол. раст. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 771.
8. Макогон И. В. Качество пыльцы *Abies* (L.) Karst. в дендрарии Донецкого ботанического сада НАН Украины / И. В. Макогон // Промышленная ботаника. – 2007. – Вып. 7. – С. 148–150.
9. Николаевская Т. С. Изучение пыльцы у аборигенных и интродуцированных в условиях Карелии представителей рода *Betula* L. / Т. С. Николаевская, Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов, О. Н. Лебедева // Тр. Карельского науч. центра РАН. – Петрозаводск, 2009. – № 4. – С. 90–95.
10. Никончук В. М. Популяційна мінливість рівня фертильності пилку і кількості насінневих зачатків у зав'язі люцерни та її зв'язок з насінневою продуктивністю: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / В. М. Никончук. – К., 2004. – 19 с.
11. Опалко О. А. Формування, морфологія і пилкова продуктивність мікроспорофілів представників роду *Malus* Mill. / О. А. Опалко // Автохтонні та інтродуковані рослини України: Зб. наук. пр. – К., 2010. – Вип. 6. – С. 30–36.
12. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / 4-е изд., перераб. и доп. / З. П. Паушева. – М., 1988. – 271 с.
13. Ahmad K. Pollen fertility estimation of some sub-tropical flora of Pakistan / K. Ahmad, N. Shaheen, M. Ahmad, M. Khan // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9 (49). – P. 8313-8317.
14. Celenk S. A palynological study of the genus *Nepeta* L. (Lamiaceae) / S. Celenk, T. Dirmenci, H. Malyer, A. Bicakci // Plant systematics and evolution. – 2008. – Vol. 276, № 1–2. – P. 105–123.
15. Dinc M. Micromorphological studies of *Lallemantia* L. (Lamiaceae) species growing in Turkey / M. Dinc, N. Pinar, S. Dogu, S. Yildirimli // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. – 2009. – 51/1. – P. 45–54.
16. Firmage D. Field Tests for Pollen Viability; a Comparative Approach / D. Firmage, A. Dafni // Acta Horticulturae. Proc. 8th Pollination Symposium. – 2001. – P. 87–94.
17. Florin R. Pollen production and incompatibilities in apples and pears / R. Florin // Horticultural Society of New York Memor. – 1927. – Vol. 3. – P. 87–118.
18. Jang T.-S. Comparative pollen morphology of *Glechoma* and *Marmoritis* (Nepetinae, Lamiaceae) / T.-S. Jang, S.-P. Hong // Journal of Systematics and Evolution. – 2010. – V. 48 (6). – P. 464–473.
19. Moon H.-K. Comparative pollen morphology and ultrastructure of *Menthae* subtribe *Nepetinae* (Lamiaceae) / H.-K. Moon, E. S. Vinckier, S. Huysmans // Review of Palaeobotany and Palynology. – 2008. – V. 149 (3–4). – P. 174–186.
20. Perveen A. Pollen morphology of the family Labiales from Pakistan / A. Perveen, M. Qaiser // Pakistan Journal of Botany. – 2003. – V. 35 (5). – P. 671–693.
21. Yankova E. Analysys on pollen and seed productivity and effectiveness in *Gentiana lutea* L. / E. Yankova, G. Baldzhiev, M. Petrova, E. Zayova, P. Yurukova: II Balcan conferense on biology, 50 years of Plovdiv (Plovdiv, 21-23 May 2010). – Plovdiv, 2010. – P. 45–48.
22. Айвазян П. К. Селекция виноградной лозы / П. К. Айвазян, Е. Н. Докучаева / Под ред. С. А. Мельника. – 1960. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vinograd.info/info/seleksiya-vinogradnoy-lozy.html>
23. Ройчев В. Р. Фертильность и жизнеспособность пыльцевых зерен у бессемянных и семенных сортов винограда и гибридных сеянцев / В. Р. Ройчев. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vinograd.info>

24. Zafar M. Pollen flora of Lamiaceae from Rawalpindi – Pakistan / M. Zafar, M. Ahmad, M. Khan. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.gu.edu.pk>

Ковтун-Водяницкая С. М. Способ проведения эксперимента по определению качества пыльцевых зерен видов рода *Nepeta* L. – Предложен способ определения фертильности и жизнеспособности пыльцевых зерен видов рода *Nepeta* L. на искусственной питательной среде. Проанализирована пыльца 28 образцов 14 видов и 1 формы. Путем эксперимента подобран оптимальный температурный режим и длительность проращивания пыльцы, изучены особенности протекания процесса прорастания. Согласно результатам оценки качества пыльцы сделан вывод об адаптивности интродуцентов рода *Nepeta* к условиям Правобережной Лесостепи Украины.

Ключевые слова: виды рода *Nepeta*, пыльца, прорастание, метод.

Kovtun-Vodyanitska S. M. The method of conducting experiment to determine the quality of pollen grains species of the genus *Nepeta* L. – A method for determining the fertility and viability of pollen grains of the genus *Nepeta* L. on the artificial nutrient medium. Pollen samples analyzed 28 of 14 species and 1 form. By experiment to select the optimal temperature and duration of the germination of pollen examined characteristics of the process of germination. According to the evaluation of the quality of pollen concluded adaptability of exotic species of genus *Nepeta* to the conditions of right-bank forest-steppe zone of Ukraine.

Key words: species of the genus *Nepeta*, pollen germination, the method.