

УДК 634.713:581.45:58.081.3:578.6

**Л.А. Грюнер<sup>1</sup>**, к.с.-х.н.  
**С.М. Мотылёва<sup>2</sup>**, к.с.-х.н.  
**Л.Г. Семёнова<sup>3</sup>**, к.б.н.

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, Россия, Орел, info@vniispk.ru

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Россия, Москва

<sup>3</sup>Филиал Майкопская опытная станция ВИР им. Н.И. Вавилова, Россия, Республика Адыгея, Подгорный

## МИКРОСКУЛЬПТУРНЫЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЛИСТЬЕВ И ПЫЛЬЦЫ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОДРОДА ЕЖЕВИКИ

### Аннотация

Цель настоящих исследований – выявление особенностей микрорельефа поверхности листа и пыльцевых зерен различных генотипов ежевики, которые могут послужить для последующего формирования банка данных ботанического и селекционно-ценного разнообразия этого растения.

Листья для исследований были взяты из средней части побегов замещения 5 сортообразцов ежевики в коллекционных насаждениях ВНИСПК в период окончательного формирования листовой пластинки (конец июня...июль), высушенная пыльца 8 сортообразцов этой культуры получена из генколлекции МОС ВИР. Высечки листьев размером 5 × 5 мм брали из средней части листа слева или справа от центральной жилки. Сравнительно-морфологическое изучение эпидермальных клеток верхней и нижней сторон листа и устьичного аппарата проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM – 6390 в условиях низкого вакуума (P = 60) на увеличениях 100...500х. Микрофотографии пыльцы выполнены на указанном микроскопе в 2010...2011гг. в лаборатории агроэкологии ВНИИСПК.

Выявлены особенности микроскульптуры поверхности листа и пыльцевых зерен ежевики, их структурных элементов. Отмечены значительные различия изученных сортообразцов по указанным признакам, что позволяет рассматривать эти признаки в качестве диагностических при идентификации и паспортизации представителей подрода *Eubatus Focke*.

**Ключевые слова:** ежевика, лист, пыльца, морфология, сканирующая электронная микроскопия, микрорельеф поверхности

UDC 634.713:581.45:58.081.3:578.6

**L.A. Gruner<sup>1</sup>**, candidate of agricultural sciences  
**S.M. Motyleva<sup>2</sup>**, candidate of agricultural sciences  
**L.G. Semenova<sup>3</sup>**, candidate of biological sciences

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISP), Russia, Orel, gruner1@rambler.ru

<sup>2</sup>Russian Breeding Technological Institute of Horticulture and Nursery Growing, Russia, Moscow, motyleva\_svetlana@mail.ru

<sup>3</sup>Maikop experimental station of VIR, Russia, Republic of Adygea, Podgorny

## MICROSCULPTURAL AND MORPHOMETRIC CHARACTERS OF LEAVES AND POLLEN OF SOME BLACKBERRY SPECIMEN

### Abstract

The goal of the research was to determine the features of the microrelief of leaf surface and pollen grains of different blackberry genotypes which might serve for the following formation of database of botanic and breeding valuable diversity of this plant.

The leaves for study were taken from the middle part of primacanes of five blackberry specimen from the VNIISPK collection during the period of the final formation of a leaf blade (late June-July). Dried pollen of eight blackberry specimen was received from the Maikop Experimental Station. Leaf pieces 5 × 5 mm were taken from the middle part of the leaf on the left and on the right from the midrib. The comparative morphological study of epidermal cells of upper and down leaf sides and stoma was performed on the scanning electron microscope JEOL JSM-6390 in conditions of low vacuum (P = 60) on 100...500 multiple magnification. Micro pictures of the pollen were performed on the same microscope in 2010...2011 in the VNIISPK laboratory of agroecology.

The features of the microsculpture of blackberry leaf surface, pollen grains and their structure elements were determined. Significant differences in the given characters were observed among studied specimen. Those characters might be considered as diagnostic ones when identifying and certificating *Eubatus Focke* specimen.

**Key words:** blackberry, leaf, pollen, morphology, scanning electron microscopy, surface microrelief

### Введение

Ежевика – род *Rubus*, подрод *Eubatus Focke* – отличается исключительным морфологическим разнообразием своих представителей [1, 2, 3, 7]. В мировой флоре описано более 200 видов этого растения, из них около 40 видов произрастают на территории бывшего СССР [1, 7], а также большое количество межвидовых форм, несколько десятков сортов, созданных в разных странах мира, преимущественно в США. Ежевика является одним из сложнейших таксонов также из-за большого диапазона пloidности его представителей (от 2 до 12х), с преобладанием среди них тетраплоидов.

Одним из наиболее значимых апробационных признаков у ежевики является лист. В средней части побега текущего года он обычно стабилен и имеется в наличии на всех этапах вегетации растения. Однако нередко даже в пределах одного вида ежевики могут быть существенные морфологические различия листа, в первую очередь, касающиеся его формы и количества листочков (лист сложный). И, напротив, иногда виды, описанные авторами как разные, отличаются лишь каким-то одним незначительным признаком листа. В связи с этим возможности сканирующей электронной микроскопии могут существенно дополнить сведения о морфологии листа разных форм ежевики данными о микрорельефе его поверхности и особенностях микроструктурных элементов, которые наиболее точно могут показать сходство или различия между представителями данного подрода, возможно, даже их филогенетические связи, признаки адаптивности к неблагоприятным факторам среды и т.п.

Не менее важным диагностическим элементом является пыльца растений. Рядом авторов установлено, что комплекс морфологических признаков пыльцы позволяет выявить различия (или сходство) между близкими видами или сортами, морфологическую неоднородность, в особенности изменчивость ее размеров, вызванную гибридизацией или полиморфизмом [4, 5]. В связи с этим ценным, на наш взгляд, является поиск таких признаков пыльцы у ежевики.

Цель настоящих исследований – выявление особенностей микрорельефа поверхности листа и пыльцевых зерен различных генотипов ежевики, которые могут послужить для последующего формирования банка данных ботанического и селекционно-ценного разнообразия этого растения.

### Материал и методы исследований

Листья для исследований были собраны в коллекционных насаждениях ежевики ВНИСПК, пыльца – получена по заявке из генколлекции МОС ВИР. Объектами исследований послужили листья 5 сортообразцов ежевики, взятые из средней части побегов замещения и высушенная пыльца 8 сортообразцов этой культуры, заготовленная во время цветения. Отбор образцов листа проводили в период окончательного формирования листовой пластинки (конец июня – июль). Высечки размером 5 × 5 мм брали из средней части листа слева или справа от центральной жилки. Сравнительно-морфологическое изучение эпидермальных клеток адаксиальной (верхней) и абаксиальной (нижней) сторон листа и устьичного аппарата проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM – 6390 в условиях низкого вакуума ( $P = 60$ ) на увеличениях 100...500. Микрофотографии пыльцы выполнены также на указанном микроскопе в 2010...2011 гг. в лаборатории агроэкологии ВНИСПК.

### Результаты и их обсуждение

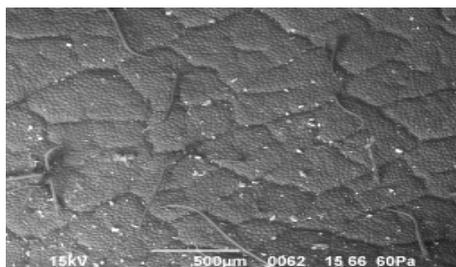
Рисунок кутикулы листьев и другие морфологические особенности строения обычно являются генетически обусловленными, стабильными признаками и, значит, могут использоваться для идентификации растений, уточнения их систематического положения, пополнения сведений о сортовых, видовых и родовых сходствах и различиях генотипов, выявления наследования признаков. Морфометрическая характеристика поверхности листьев изучавшихся сортов ежевики представлена в таблице 1.

Из полученных данных видно, что у сортообразцов *Thornfree* и с-ца сорта *Loch Ness* клетки адаксиальной стороны листа вытянутые – длина существенно превышает ширину. Устьица овальной формы, их количество варьирует по сортам от 297,7 до 719,6. У пряморослых сортов *Erie* и *Agawam* количество устьиц почти вдвое больше, чем у других сортообразцов.

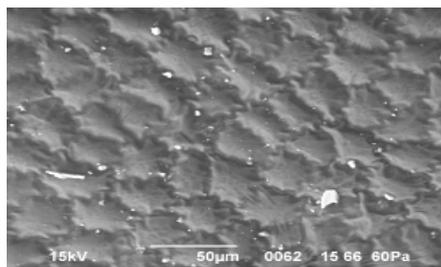
Таблица 1 – Морфометрические параметры адаксиальной и абаксиальной поверхностей листьев ежевики

| Сорт                         | Адаксиальная сторона листа       |                          |   | Абаксиальная сторона листа       |                   |                                 |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------|---|----------------------------------|-------------------|---------------------------------|
|                              | Число клеток на 1мм <sup>2</sup> | Периметр основных клеток | Отношение длины основных клеток к ширине, мкм | Число устьиц на 1мм <sup>2</sup> | Длина устьиц, мкм | Отношение длины устьиц к ширине |
| <i>Agawam</i>                | 471,5±2,4                        | 103,9±1,0                | 1,5±0,4                                       | 620,3±0,8                        | 12,0±0,2          | 1,9±0,1                         |
| <i>Thornfree</i>             | 547,4±2,2                        | 139,2±0,8                | 2,8±0,2                                       | 297,7±0,6                        | 13,1±0,2          | 1,8±0,3                         |
| <i>Erie</i>                  | 478,4±1,2                        | 103,6±1,2                | 1,4±0,4                                       | 719,6±0,6                        | 9,8±0,2           | 1,6±0,2                         |
| с-ц сорта <i>Loch Ness</i>   | 445,2±2,8                        | 103,5±0,8                | 2,2±0,4                                       | 347,3±0,6                        | 9,8±0,1           | 1,7±0,2                         |
| с-ц сорта <i>Black Satin</i> | 586,8±2,4                        | 121,4±1,0                | 1,2±0,2                                       | 446,6±0,4                        | 11,7±0,2          | 1,4±0,2                         |

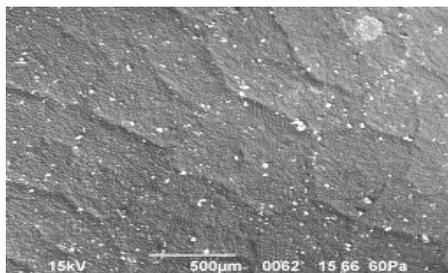
Основные клетки адаксиальной стороны листа овальной формы или изометрические, антиклинальные стенки волнистые, складчатость кутикулы незначительная, восковой покров ровный, гладкий (рисунок 1). На абаксиальной стороне листа располагаются устьица и множественные волоски (трихомы, рисунки 3, 4). Кутикула мелко- или редкоскладчатая. Восковой покров равномерный. Устьица относительно поверхности листа располагаются на уровне поверхности (у сортообразцов *Agawam*, *Thornfree*, с-ц *Loch Ness*) или незначительно возвышаются над поверхностью (сортообразцы *Erie* и с-ц *Black Satin*), рисунок 2.



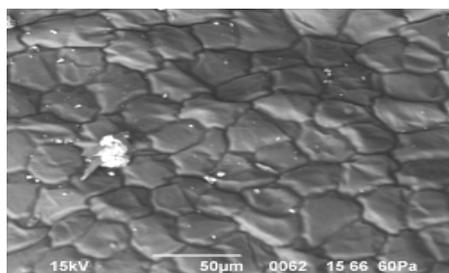
1



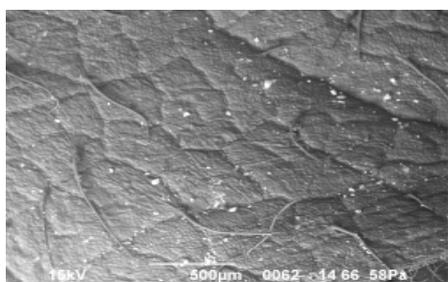
1a



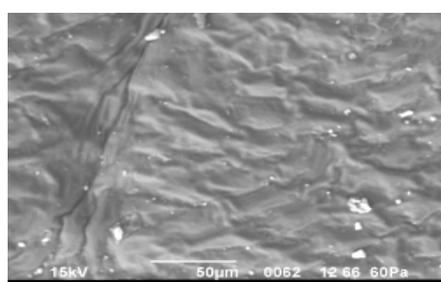
2



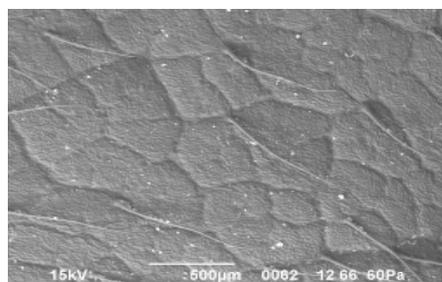
2a



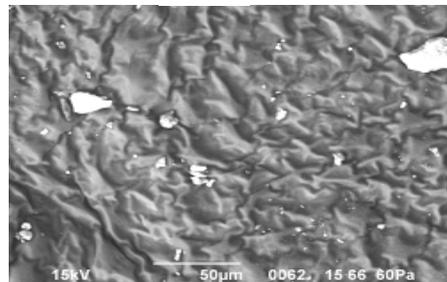
3



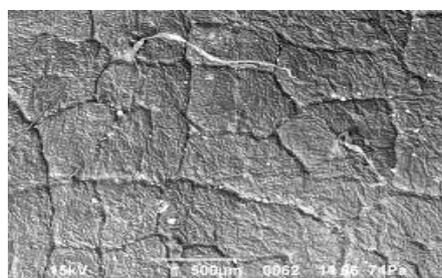
3a



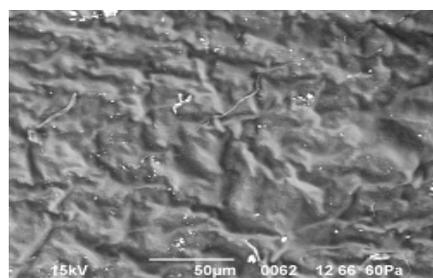
4



4a



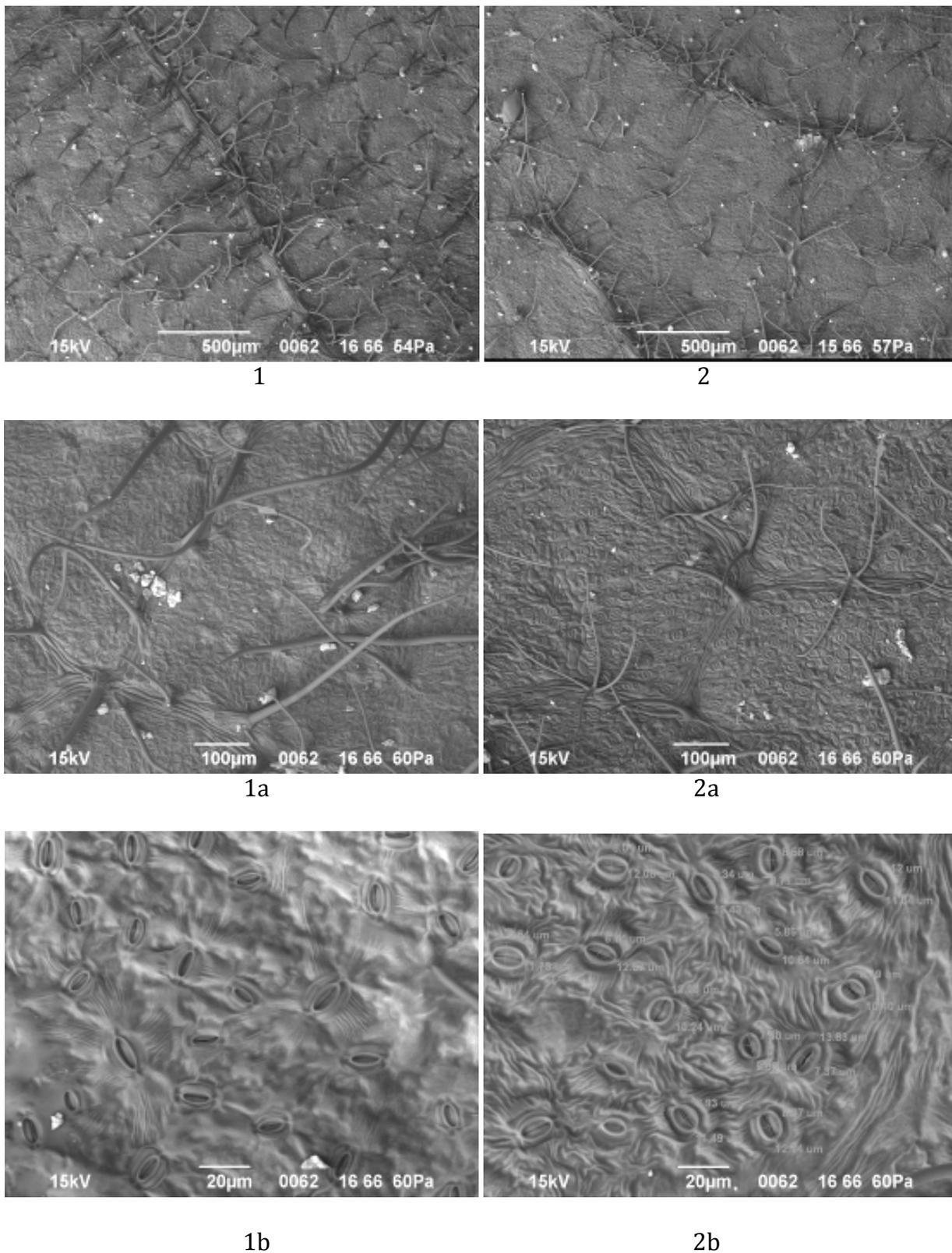
5



5a

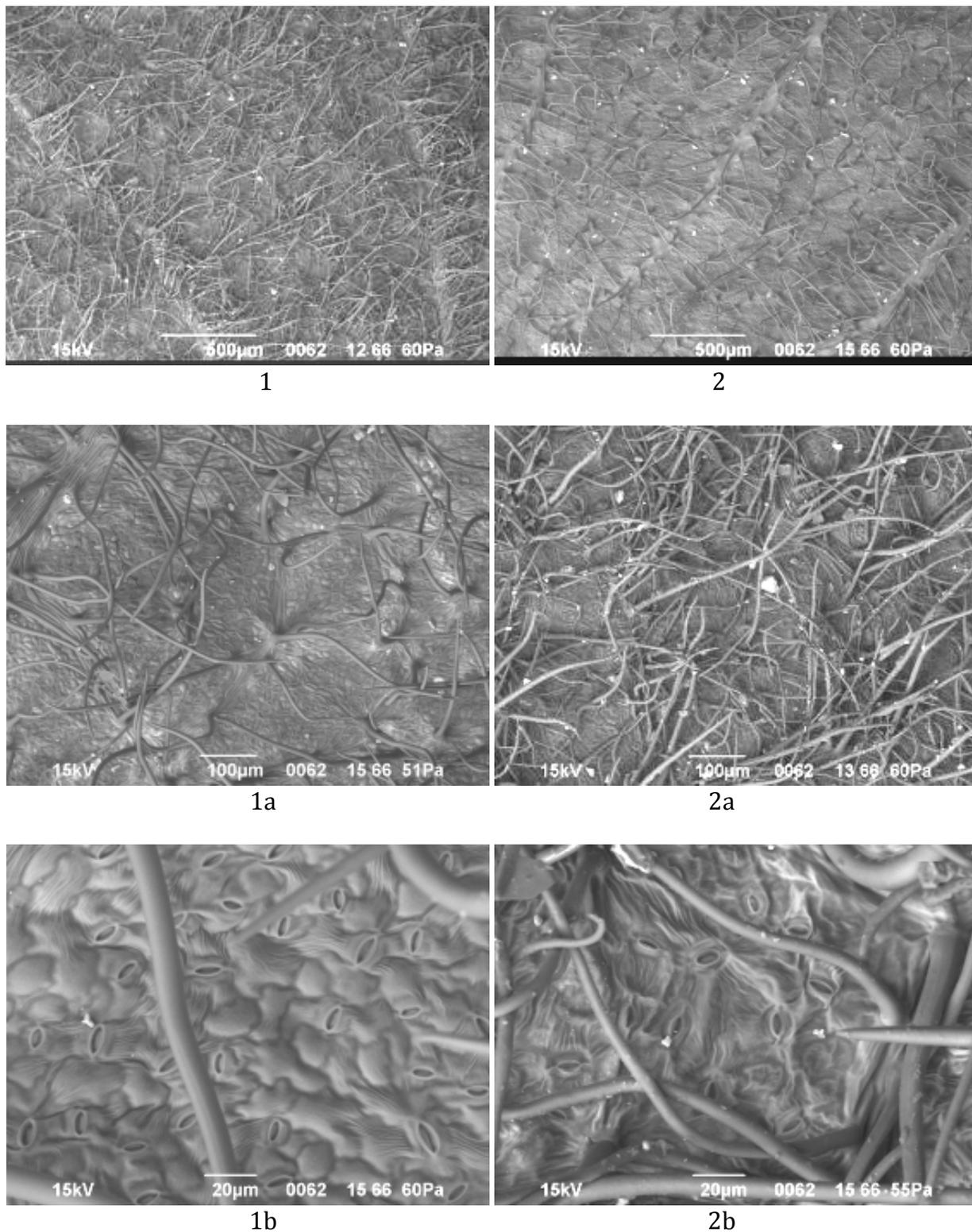
1, 1a – сорт Agawam; 2, 2a – сорт Black Satin; 3, 3a – сорт Erie;  
4, 4a – сорт Loch Ness; 5, 5a – Thornfree

Рисунок 1 – Особенности микрорельефа верхней эпидермы листа ежевики



1, 1a, 1b – сорт *Agawam*; 2, 2a, 2b – с-ц *Black Satin*

Рисунок 2 – Особенности микрорельефа нижней эпидермы листа ежевики



1, 1a, 1b – Erie; 2, 2a, 2b – с-ц Loch Ness

Рисунок 3 – Особенности микрорельефа нижней эпидермы листа ежевики

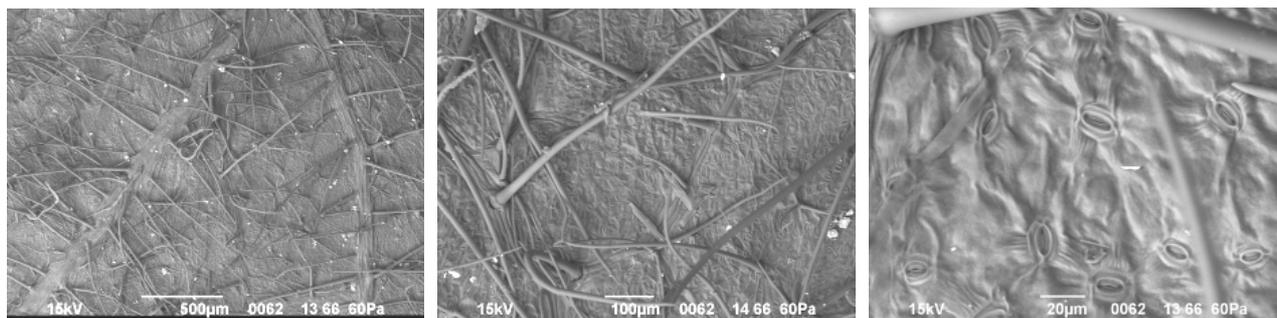


Рисунок 4 – Особенности микрорельефа нижней эпидермы листа ежевики, сорт Thornfree

Морфометрические показатели пыльцевых зерен ежевики представлены в таблице 2. Средний размер полярной оси для пыльцевых зерен, изученных представителей подрода *Eubatus Focke*, находится в пределах 32,43...37,46 мкм; экваториальный диаметр – в пределах 16,91...18,88 мкм. Отношение длины полярной оси к длине экваториальной (P/E) характеризует степень вытянутости (округлости) пыльцевых зерен. Пыльца сортов Agavam, Flint, Mc. Donald, Smoothstem и Thornfree более вытянута, по сравнению с пыльцой остальных исследуемых сортов. Из этих сортов Smoothstem и Thornfree близкородственны. Возможно, и остальные 3 сорта филогенетически связаны между собой.

Таблица 2 – Морфологическая характеристика пыльцевых зерен представителей подрода *Eubatus Focke*

| Измерения     | n  | Min, мкм | Max, мкм | Среднее, мкм | V, %  | P/E  |
|---------------|----|----------|----------|--------------|-------|------|
| Agavam        |    |          |          |              |       |      |
| P             | 40 | 27,91    | 39,62    | 36,22        | 6,83  | 2,06 |
| E             | 40 | 15,28    | 22,01    | 18,55        | 5,62  |      |
| Darrow        |    |          |          |              |       |      |
| P             | 45 | 30,59    | 39,61    | 34,83        | 6,71  | 1,76 |
| E             | 45 | 12,91    | 19,81    | 16,91        | 9,89  |      |
| Erie          |    |          |          |              |       |      |
| P             | 45 | 17,61    | 37,94    | 32,43        | 6,71  | 1,88 |
| E             | 45 | 13,59    | 21,11    | 17,29        | 10,31 |      |
| Flint         |    |          |          |              |       |      |
| P             | 45 | 33,45    | 39,77    | 37,46        | 3,67  | 2,09 |
| E             | 45 | 15,64    | 19,17    | 17,85        | 5,63  |      |
| Maxwell Early |    |          |          |              |       |      |
| P             | 50 | 29,31    | 42,19    | 35,87        | 8,64  | 1,89 |
| E             | 50 | 13,31    | 22,32    | 18,88        | 9,59  |      |
| Mc, Donald    |    |          |          |              |       |      |
| P             | 50 | 22,52    | 38,97    | 33,05        | 8,24  | 2,02 |
| E             | 50 | 10,2     | 19,56    | 16,39        | 10,99 |      |
| Smoothstem    |    |          |          |              |       |      |
| P             | 45 | 32,76    | 40,23    | 35,66        | 5,72  | 2,01 |
| E             | 45 | 15,23    | 21,11    | 17,71        | 7,87  |      |
| Thornfree     |    |          |          |              |       |      |
| P             | 40 | 30,52    | 39,34    | 34,92        | 6,83  | 1,99 |
| E             | 40 | 14,64    | 23,11    | 17,58        | 9,14  |      |

Полученные нами результаты согласуются с описанием пыльцевых зерен и

данными, полученными при исследовании пыльцы *R. caesius L.* из Латвии [4]. Форма пыльцевых зерен продолговато-эллипсоидальной формы, борозды длинные (рисунок 5 А, Б, Д, И). В очертании с полюса пыльцевые зерна округлые. На полученных нами фотографиях отчетливо видно, что пыльцевые зерна представленных сортообразцов ежевики 3- и 4- бороздно-поровые (рисунок 5С), тогда как по данным Л.А. Куприяновой и Л.А. Алешиной (1978), пыльца *R. caesius L.* только 3-бороздно-поровая. Вероятно, это связано с использованием авторами световой микроскопии, на приведенных ими рисунках отсутствует положение «вид с полюса», а со стороны экватора сложно рассмотреть количество борозд.

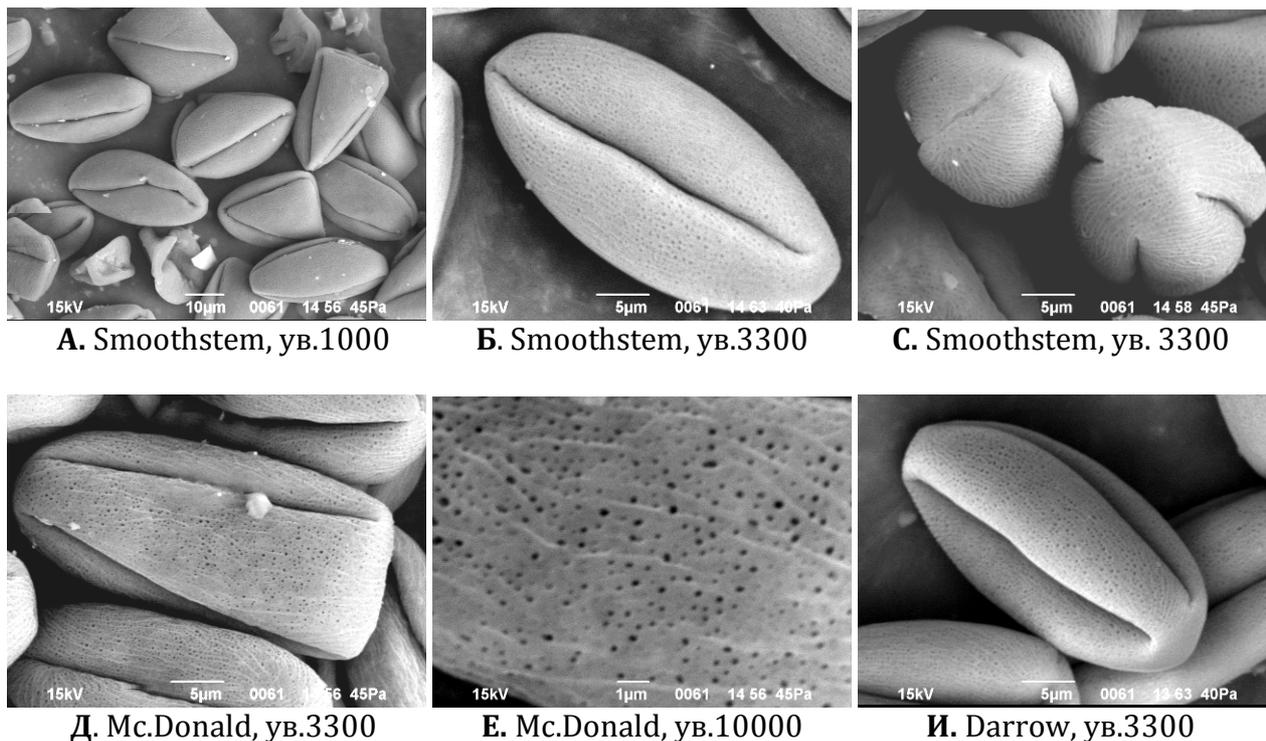


Рисунок 5 – Пыльцевые зерна некоторых сортов подрода *Eubatus Focke*

Орнамент экзины нежно-струйчатый, тонко-сетчатый, рисунок имеет сортовые особенности (рисунок 5Е). Количество деформированных пыльцевых зерен до 20...35%. Это, в определенной мере, может быть связано с незрелостью части пыльцы, а также полиплоидностью растений.

### Выводы

1. Проведенные исследования показали значительные различия микрорельефа поверхности листа и его структурных компонентов изученных сортообразцов ежевики, что позволяет рассматривать их в качестве диагностических при идентификации и паспортизации представителей подрода *Eubatus Focke*.

2. Количество устьиц у пряморослых сортов с наиболее коротким периодом вегетации значительно превышает их количество у представителей других морфологических групп (стелющихся и полустелющихся), что может свидетельствовать об их филогенетической приуроченности к более влажным местам обитания.

3. Исследование пыльцы ежевики с помощью сканирующего электронного микроскопа позволило выделить наиболее важные показатели, которые можно

использовать в качестве апробационных для представителей подрода ежевики. Это форма (степень вытянутости пыльцевых зерен, соотношение длины и ширины), количество борозд и рисунок (микроскульптура) поверхности, которые достаточно сортоспецифичны

### Литература

1. Гроссгейм А.А. Флора Кавказа. М.-Л.: АН СССР, 1952. Т.V. С. 44-58.
2. Грюнер Л.А. Классификатор рода *Rubus* L, подрода *Eubatus* Focke. СПб: ВИР, 1993. 26 с.
3. Грюнер Л.А. Ежевика // Помология. Земляника. Малина. Орехоплодные и редкие культуры. Т.V. Орел: ВНИИСПК, 2014. С.300-308.
4. Куприянова Л.А., Алешина Л.А. Пыльца двудольных растений флоры Европейской части СССР. *Laminaceae – Zygophyllaceae*. Л.: Наука, 1978. С.111.
5. Цаценко Л.В., Синельникова А.С. Пыльцевой анализ в селекции растений [Электронный ресурс] // Научный журнал КубГАУ. 2012. №77(03). С.1-11. URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/09.pdf>. (дата обращения 15 декабря 2015 г.)
6. Эрдтман Г. Морфология пыльцы и систематика растений (Введение в палинологию) I. Покрытосеменные. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1956. 456с.
7. Юзепчук С.В. Малина и ежевика. В кн. Флора СССР. М.-Л.: АН СССР, 1941. Т.8. С.21-58.
8. PalDat [Электронный ресурс] Palynological Database. URL: <https://www.paldat.org/search/genus/Rubus>. Дата обращения 15 декабря 2015 г.

### References

1. Grossgeim A.A. (1952): Vegetable wealth of the Caucasus. Moscow: 44-58. (In Russian).
2. Gruner L.A. (1993): The classificatory of *Rubus* L. genus, *Eubatus* Focke subgenus N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, Saint Petersburg. (In Russian).
3. Gruner L.A. (2014): Blackberries. In: Sedov E.N. Gruner L.A. (ed.) Pomology. Strawberries. Raspberries. Nut and rare crops, Vol. 5. VNIISPК, Orel, 300-308. (in Russian).
4. Kupriyanova L.A., Aleshina L.A. (1978): Pollen dicotyledons flora of the European part of the USSR. Nauka, Leningrad. (In Russian).
5. Tsatsenko L.V., Sinelnikova A.S. (2012): Pollen analysis in plant breeding. Scientific Journal of KubSAU, 77(3). Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/09.pdf>. (In Russian).
6. Erdtman G. (1956): Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms. Inostrannaya literatura, Moscow. (In Russian).
7. Yuzepchuk S.V. (1941): Raspberries and blackberries. In: Flora of the USSR. Akademiya nauk SSSR, Leningrad, Moscow, 8: 21-58. (In Russian).
8. PalDat – Palynological Database <https://www.paldat.org/search/genus/Rubus>.