

Санников С.Н. и др. Генетическая дифференциация популяций сосны обыкновенной в Карпатах и на Русской равнине // Экология. 1997. № 3. С. 163-167.

Шиятов С.Г. Дендрохронология верхней границы леса на Урале. М.: Наука, 1986.

Яцык Р.М. О популяционной изменчивости сосны обыкновенной реликтового происхождения // Лесоводство и агролесомелиорация. Киев. 1977. Вып. 48. С.21-25.

Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V 106. P. 283-292.

Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89. P. 583-590.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 96-04-50945.

УДК 630.174:754:630.425

С.Г. Махнева, Г.В. Зуева

**(Уральская государственная лесотехническая академия,
Проблемная научно-исследовательская лаборатория)**

КАЧЕСТВО ПЫЛЬЦЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ

Показан высокий уровень индивидуальной изменчивости модельных деревьев по качеству пыльцы в насаждениях сосны обыкновенной, произрастающих в условиях загрязнения среды фторсодержащими аэрополлютантами. Изучены закономерности изменения фертильности пыльцы на различных стадиях микрогаметогенеза. Установлено, что уровень фертильности пыльцы сосны в насаждениях не находится в прямой зависимости от расстояния до источника выбросов. Выделена группа деревьев со стабильно высоким качеством пыльцы, перспективных для селекционных работ по отбору устойчивых форм для лесовосстановления на техногенных территориях.

Репродуктивные процессы живых организмов зависят как от генетических факторов, так и от условий внешней среды. Для практической селекции и семеноводства последних десятилетий особый интерес представляет изучение механизмов устойчивости генеративной сферы к ан-

тропогенным факторам, что определяет необходимость детального изучения течения эмбриональных процессов в норме и в патологии. В работе представлены результаты многолетнего изучения процесса развития мужского гаметофита у сосны обыкновенной, произрастающей на различном удалении от Полевского криолитового завода (ПКЗ).

Мутагенный и цитотоксический эффект фторсодержащих поллютантов был получен во многих лабораторных экспериментах и природных условиях. Отмечено, что фтор вызывает нарушение структуры хромосом в соматических и генеративных тканях, ингибирует ферменты, в том числе и ферменты репарации ДНК. Большинство работ, посвященных химическому мутагенезу, выполнено на организмах с коротким циклом развития и при определенной экспозиции действия конкретного фактора. Полученные результаты трудно экстраполировать на реальную ситуацию в природной среде, где действует комплекс внешних факторов, которые, модифицируя влияние друг друга, могут приводить к неожиданным эффектам.

Постоянные пробные площади (ППП) закладывались на расстоянии 1,5-2 км от завода (ППП 1) - импактная зона, 3,5 км (ППП 2) и 26 км (ППП 4) - буферная зона на территориях соответственно сильного, среднего и слабого загрязнения фторсоединениями, определяемых в соответствии с величиной техногенной нагрузки и степенью антропогенной трансформации биоценозов, в 35-летних насаждениях сосны обыкновенной. Почвы под насаждениями серые лесные разной степени оподзоленности (Бабушкина и др., 1993). В качестве контрольной площади (ППП К) выбраны насаждения сосны того же возраста, произрастающие в биотопически сходных условиях, в районе г. Сысерти. Микростробилы с каждого из 30-40 деревьев пробной площади фиксировались в уксусно-этиловой смеси (1:3) на разных стадиях микрогаметогенеза. Для определения фертильности пыльцы (ФП) готовили временные препараты, окрашивали их ацетокармином (Паушева, 1970). В каждом варианте анализировали по 500 пыльцевых зерен в четырехкратной повторности. Для определения ФП мы использовали комплекс морфологических, цитологических, цитогенетических и физиологических признаков пыльцевого зерна (ПЗ) сосны обыкновенной. Хромосомные aberrации классифицировали по общепринятой в цитогенетике методике (Паушева, 1970). Наличие запасных питательных веществ в пыльце определялось при помощи гистохимических реакций на крахмал и жиры соответственно реактивом Люголя и суданом 3 (Прозина, 1960). Изучение микрогаметогенеза сосны проводили при помощи светового микроскопа Studar E.

В развитии ПЗ сосны обыкновенной мы условно выделили несколько этапов, которые были описаны нами как различные стадии микрога-

метогагенеза. Каждой стадии развития мужского гаметофита сосны соответствуют характерные для нее морфологические и физиолого-биохимические особенности:

первая стадия:

а) после завершения микроспорогенеза тетрады распадаются на свободные микроспоры, которые дают начало ПЗ. Пыльцевые зерна сосны в своем развитии претерпевают три клеточных деления;

б) первое деление - это деление микроспоры, в результате которого образуются первая проталлиальная клетка и инициаль антеридия.

вторая стадия:

а) инициаль антеридия в процессе второго деления дает начало антеридиальной и второй проталлиальной клеткам;

б) в третьем делении образуются генеративная клетка и клетка трубки. Общее число делений в микрогаметогенезе у сосны равно пяти, два из них - после проникновения ПЗ в семязпочку.

Принимая во внимание отмечаемую во многих исследованиях высокую чувствительность мужских репродуктивных структур к экстремальным факторам внешней среды, мы попытались оценить степень отклонения показателей качества пыльцы от среднепопуляционных в одновозрастных насаждениях сосны на различном удалении от источника фторсодержащих аэроплютантов. С этой целью сравнивались показатели качества пыльцы:

по средним для насаждения данным в разные годы;

на различных стадиях микрогаметогенеза;

в насаждениях на различном удалении от источника пллютантов;

у индивидуальных особей сосны в пределах одного насаждения.

Степень ФП, оцениваемая по комплексу признаков ПЗ (Зуева, Махнева, 1993), использовалась нами в качестве критерия состояния мужской репродуктивной системы сосны в зоне загрязнения фторсодержащими аэроплютантами.

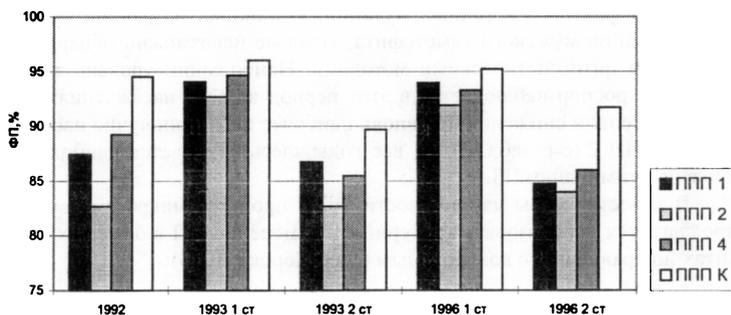
В результате проведенных исследований установлено, что уровень ФП в исследуемых насаждениях сосны варьирует по годам незначительно в пределах одной ППП (табл. 1). За весь период изучения репродуктивных структур сосны нами не отмечалось ни в один год сильных отклонений от нормы в развитии пыльцы в исследуемых насаждениях, несмотря на то что погодные условия не всегда благоприятствовали нормальному развитию мейоза и гаметогенеза (по стадиям).

Сравнительное исследование пыльцы сосны на различном удалении от ПКЗ показало, что ФП на всех стадиях микрогаметогенеза в опытных

ППП ниже, чем в контрольном насаждении (см. табл. 1, рисунок). Наиболее низкое качество пыльцы во все годы изучения установлено на ППП 2 на удалении 3,5 км от ПКЗ, несмотря на то что уровень загрязнения фторсодержащими поллютантами здесь значительно ниже, чем на ППП 1: в хвое сосны второго года жизни фторидов накапливается в 5,3, в снеге - в 2,1, в почве - в 1,3 раза меньше, чем на ППП 1 (Бабушкина и др., 1993).

Фертильность пыльцы значительно снижается ко времени созревания ПЗ во всех исследуемых насаждениях сосны (см. табл.1, рисунок). Различия по ФП на стадиях микрогаметогенеза были достоверны во все годы на всех ППП при $P = 95-99\%$.

В пределах одной ППП обнаружена значительная неоднородность особей в насаждении по степени ФП. Так, в 1996 г. на ППП 1 на первой стадии микрогаметогенеза фертильность при среднем значении



Фертильность пыльцы сосны на опытных и контрольной ППП на стадиях микрогаметогенеза в разные годы

93,99% варьирует в пределах 79,30 - 99,45%, коэффициент вариации (K_v) равен 4,89%, на ППП 2 - при среднем значении 91,91% фертильность варьирует в пределах 73,15 - 98,75% при K_v 7,51% (см. табл. 1). Подобное явление повторяется из года в год на опытных пробных площадях и присуще их характерным особенностям, в отличие от контрольной, где степень варьирования по количеству полноценной пыльцы между особями в насаждении намного меньше. Степень дифференциации особей в насаждении значительно увеличивается к моменту пыления, достигая 31- 46% в разные годы, в соответствии с чем растет и K_v . На

контрольной площади разница между наибольшими и наименьшими значениями ФП особей сосны не превышает 9,1-12,5%, а K_v - не более 5,3%.

На стадии ювенильных микроспор во всех насаждениях нами обнаружено значительное число особей сосны, для которых характерно высокое качество пыльцы. Наибольшее число особей с высокой ФП установлено на ПППП 1 и ПППП К, соответственно 50,0 и 60,61% (табл. 2), однако и на других пробных площадях 43,3% особей сосны имеют высокую ФП. Структура распределения особей по признаку ФП в насаждениях значительно изменяется к моменту созревания ПЗ. В этот период за счет элиминации нежизнеспособных гаметофитов увеличивается доля особей с ФП 80-85 и 90-95% на всех ПППП. Значительное увеличение числа элиминирующих гаметофитов ко времени созревания ПЗ объясняется, вероятно, эмбриотоксическим действием поллютантов, а также проявлением скрытых диплоидным состоянием спорофита рецессивных летальных факторов и генных мутаций, возникших на ранних стадиях формирования мужского гаметофита, которые невозможно обнаружить обычными цитогенетическими методами. Наибольший уровень элиминации микроспор наблюдается в этот период во всех насаждениях. Однако по степени снижения ФП вновь наиболее неблагоприятно насаждение на ПППП 2 (см. табл. 2): во все годы здесь отмечается наибольший уровень элиминации ПЗ.

В качестве меры изменчивости ФП в процессе микрогаметогенеза предлагается использовать критерий d - изменение ФП в опытных вариантах по сравнению с контрольным (Лях, Сорока, 1993):

$$d = \frac{K - O}{K} 100\%$$

где K - ФП в контрольном насаждении;

O - ФП в опытных насаждениях.

Наибольшие различия опытного варианта с контрольным по изменению ФП установлены для ПППП 2, наименьшие - для ПППП 4 на первой стадии микрогаметогенеза (табл. 3).

Как видно из табл. 3, ко времени созревания пыльцы различия между опытными и контрольным насаждениями сосны усиливаются: наибольшие (7,93%) - вновь на ПППП 2, наименьшие (4,6%) - на ПППП 1.

Таблица 1

Фертильность пыльцы сосны в насаждениях на различном удалении от ПКЗ, %

№	Год отбора пыльцы	Стадии микрогаметогенеза						Коэффициент вариации
		1			2			
		Фертильность пыльцы среднее	min - max	Коэффициент вариации	Фертильность пыльцы среднее	min - max	Коэффициент вариации	
1	1992	-	-	-	87,46 ± 1,55	62,87 - 95,60	9,73	
	1993	94,04 ± 1,16 *	65,30 - 99,10	6,73	86,72 ± 1,72	49,40 - 95,10	10,87	
	1996	93,99 ± 0,79 *	79,30 - 99,45	4,89 *	84,73 ± 1,67	51,55 - 94,65	11,51	
	1997	-	-	-	87,30 ± 1,52	62,50 - 94,70	9,36	
Среднее	94,02 ± 0,03 *	-	5,81	86,55 ± 0,63 **	-	10,37		
2	1992	-	-	-	83,45 ± 2,17	67,60 - 96,95	11,03	
	1993	92,69 ± 1,47 *	76,50 - 98,83	7,08 *	82,68 ± 2,41	49,26 - 97,75	13,99	
	1996	91,91 ± 1,26 **	73,15 - 98,75	7,51	83,97 ± 1,86	51,80 - 96,00	12,13	
	1997	-	-	-	84,02 ± 2,98	45,10 - 95,90	15,47	
Среднее	92,30 ± 0,39 **	-	7,3	83,53 ± 0,31 **	-	13,16		
4	1992	-	-	-	89,43 ± 1,32	78,03 - 98,47	6,58	
	1993	94,80 ± 0,64 *	85,84 - 98,27	3,22 *	82,42 ± 2,57	48,50 - 94,55	14,94	
	1996	93,71 ± 0,57 *	84,10 - 99,20	3,89 *	84,79 ± 1,64	38,95 - 96,60	12,41	
	Среднее	94,26 ± 0,55 *	-	3,56 *	85,55 ± 2,03 **	-	11,31	
К	1992	94,20 ± 0,89	75,53 - 98,27	4,88	-	-	-	
	1993	95,82 ± 0,66 *	79,52 - 98,82	3,74	89,73 ± 0,87	77,45 - 96,72	5,3	
	1996	95,21 ± 0,53 *	89,40 - 99,90	3,07	91,71 ± 0,77	80,45 - 97,85	4,75	
Среднее	95,08 ± 0,47 *	-	3,9	90,72 ± 0,99	-	5,03		

Достоверные различия между различными стадиями микрогаметогенеза по фертильности пыльцы.

* Достоверные различия опытных ППП с контрольной по фертильности пыльцы при P = 95.

Таблица 2

Количественное распределение (%) особей сосны в насаждениях
в зависимости от степени ФП

ФП	ППП 1		ППП 2		ППП 4		ППП К	
	Стадии микрогаметогенеза							
	1	2	1	2	1	2	1	2
30-70	0	5,88	0	10,00	0	6,67	0	0
70-80	2,94	11,76	10,00	16,67	0	6,67	0	0
80-85	0	26,47	0	20,00	3,33	16,67	0	12,12
85-90	20,59	17,65	13,33	20,00	20,00	20,00	9,09	12,12
90-95	26,47	38,24	33,33	26,67	33,33	36,67	30,30	51,52
95-100	50,00	0	43,33	6,67	43,33	13,33	60,61	24,24

Таблица 3

Динамика изменения ФП в опытных насаждениях по сравнению
с контрольными на двух стадиях микрогаметогенеза

ППП	Первая стадия d ₁ , %	Вторая стадия d ₂ , %
1	1,11	4,60
2	2,92	7,93
4	0,86	5,70

Примечание. d₁ и d₂ - степень снижения ФП в опытных насаждениях по сравнению с контрольными соответственно на первой и второй стадиях микрогаметогенеза.

Известно, что суммарная скорость мутирования в гаплоидной ткани сосны обыкновенной в оптимальных условиях составляет $6,76 \times 10^{-4}$ на locus на поколение, а на стадии зародыша - $1,90 \times 10^{-4}$ (Алтухов, 1989). Можно предположить, что под влиянием поллютантов происходит усиление мутационного процесса и увеличение в связи с этим коэффициента отсекающего отбора против de novo мутаций белковых локусов, которые независимо от природы возникновения (мутации или рекомбинации) одинаково отрицательно влияют на жизнеспособность деревьев (Алтухов, 1989), что способствует уменьшению генетического груза в популяции. В определенных пределах воздействия окружающей среды популяции успешно справляются с увеличением частоты исходных нарушений, отсеивая их на ранних этапах гаметогенеза и эмбриогенеза (Абатурова, Вишневецкая и др., 1980; Алтухов, 1989). Более высокие значения d на первой стадии в насаждениях на ППП 1 и ППП 2 свидетельствуют о высоком

уровне элиминации мужских гаметофитов в импактной и буферной зонах ПКЗ на ранних стадиях микрогаметогенеза, на ППП 4 более интенсивный отбор идет на стадии второго и третьего проталлиальных делений.

Таким образом, насаждение сосны в импактной зоне характеризуется более стабильными показателями развития мужских генеративных структур по сравнению с насаждениями на ППП 2 и ППП 4. Так, на ППП 1 за период с 1992 по 1996 гг. у 77% деревьев ФП не отмечалась ниже 80%, у 44% элиминация МГ не превышает 10%, в то время как на ППП 2 лишь 17% особей имеют хорошее качество пыльцы на изучаемых стадиях гаметогенеза. Необходимо отметить, что на контрольной ППП высокую ФП имеют 65% особей сосны. Более низкое качество пыльцы у особей сосны на ППП 4, находящейся на расстоянии 26 км от ПКЗ, по сравнению даже с импактной зоной. Объясняется это, вероятно, хроническим эмбриотоксическим действием тяжелых металлов и низких доз SO_2 .

Основную долю стерильной пыльцы на всех стадиях микрогаметогенеза на всех ППП составляют пыльцевые зерна с признаками дегенерации ядра и цитоплазмы вплоть до полной элиминации содержимого. Основная масса их (60-70%) на второй стадии на опытных ППП представлена пыльцевыми зернами, дегенерирующими на ранних стадиях, характеризующихся меньшими размерами, несформированной экзиной, отсутствием запасных веществ. На контрольной ППП такой пыльцы содержится не более 9%.

Пыльцевые зерна с аномальными воздушными мешками на первой стадии встречаются с той же частотой, что и дегенерированные. Как правило, по размерам и форме тела они не отличаются от нормальных. Однако на второй стадии аномалии воздушных мешков сопровождаются изменением структуры цитоплазмы, отсутствием запасных веществ и экзины. Ко времени пыления доля подобных ПЗ снижается, что сопровождается увеличением числа дегенерирующих ПЗ, имеющих аномальные воздушные мешки. Вероятно, аномалии воздушных мешков могут быть диагностирующим признаком генетических и метаболических нарушений ПЗ.

Образование мелких ПЗ может быть связано с потерей хромосом и фрагментов в результате разрывов в процессе микроспорогенеза, а также с остановкой в развитии ПЗ. Таких ПЗ немного, ко второй стадии они, в основном, элиминируют.

Анализ процесса микрогаметогенеза сосны обыкновенной, произрастающей на различном удалении от источника фторсодержащих аэрополлютантов, позволил выявить следующие особенности:

1. При низкой устойчивости хвойных растений к кислотным токсикантам в насаждениях сосны отмечается высокий уровень индивидуальной изменчивости особей по чувствительности мужской генеративной сферы.

2. Степень ФП сосны в исследуемых насаждениях не находится в прямой зависимости от расстояния от источника выбросов. Снижение интенсивности гаметофитного отбора в насаждениях сосны в импактной зоне ПКЗ происходит, вероятно, вследствие элиминации чувствительных генотипов из насаждения на разных стадиях онтогенеза под влиянием острых доз токсикантов, снижением чувствительности половых структур вследствие элиминации на ранних стадиях развития мужских репродуктивных органов (заложения, детерминации и дифференциации), а также адаптацией растений к загрязняющим веществам.

3. Установлено, что ФП сосны в импактной и буферной зонах ПКЗ на всех стадиях микрогаметогенеза ниже, чем на контрольной ППП.

4. Фертильность снижается ко времени созревания пыльцы во всех насаждениях сосны, но более значительно - на опытных ППП в зоне влияния поллютантов ПКЗ.

5. В опытных насаждениях сосны обыкновенной обнаружена значительная неоднородность особей по чувствительности мужской генеративной сферы к действию поллютантов.

6. На опытных ППП выделена группа особей сосны обыкновенной со стабильно высоким в изучаемый период качеством пыльцы, перспективных для селекционных работ по отбору устойчивых форм для лесовосстановления на техногенных территориях.

7. Дальнейшее изучение особей сосны на антропогенных территориях методами популяционной биологии позволит составить более полную характеристику репродуктивной системы и выявить маркерные признаки толерантности и адаптивности генотипов к экстремальным факторам среды.

ЛИТЕРАТУРА

Абатурова М.П., Вишневецкая К.Д., Духарев В.А. Генетические последствия загрязнения окружающей среды в популяциях хвойных // Лесная генетика, селекция и физиология древесных растений: Материалы междунар. симпоз. Воронеж, 1980. С. 103-104.

Бабушкина Л.Г. и др. Экологическое состояние лесных насаждений в зоне фторсодержащих промышленных выбросов // Экология. 1993. № 1. С. 26-35.

Зуева Г.В., Махнева С.Г. Фертильность пыльцы сосны обыкновенной // Леса Урала. Екатеринбург: УЛТИ, 1993. С. 35-46.

Лях В.А., Сорока А.И. Чувствительность мужского гаметофита некоторых древесных растений к тяжелым металлам // Ботанический журнал. 1996. Т. 81. № 1. С. 96-100.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1970. 256 с.

Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. М.: Высш. шк., 1960.