

Таким образом, в результате предварительных исследований показана неоднозначность варьирования исследуемых биохимических показателей в хвое побегов и деревьев сосны в зависимости от сексуализации и состояния, что следует учитывать при использовании этих показателей в качестве критериев нарушения метаболизма сосны в зоне промышленного загрязнения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Бабушкина Л.Г., Хухарева Л.А. и др. Процессы липопероксидации хвои сосны обыкновенной в условиях аэротехногенного загрязнения//Растения и промышленная среда: Тез. докл. Днепропетровск, 1990. С. 67-68.

Габукова В.А., Чиненова Л.А. Метаболизм и сексуализация побегов сосны на лесосеменной плантации//Проблемы физиологии и биохимии древесных растений: Тез. докл. Петрозаводск, 1989. С. 163-164.

Самсонова А.Е., Болгова Т.Б., Ефремова Н.Л. Особенности физиолого-биохимических процессов у сосны обыкновенной в связи с половой дифференциацией//Проблемы физиологии и биохимии древесных растений: Тез. докл. Петрозаводск, 1989. С. 190-192.

УДК 630.174:754:630.425

Г.В. Зуева, С.Г. Махнева
(Уральский лесотехнический институт)

ФЕРТИЛЬНОСТЬ ПЫЛЬЦЫ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ АТМОСФЕРЫ

Представлена схема программы лесовосстановления в зонах промышленного загрязнения Урала с использованием цитогенетических методов иссле-

дования популяции сосны обыкновенной. Выявлено, что степень и типы аномалий микроспорогенеза и структуры пыльцевого зерна сильно варьируются у особей в пределах одной популяции. Показано, что по мере удаления от источника загрязнения спектр нарушений в пыльце увеличивается и степень фертильности ее уменьшается.

Долгосрочная (1991–2010 гг.) программа научно-исследовательской работы проблемной научно-исследовательской лаборатории Уральского лесотехнического института по лесоводству и лесовосстановлению в зонах промышленного загрязнения включает изучение долговременного генетического улучшения лесов Урала. Целями программы являются разработка цитогенетических методов изучения репродуктивного состояния сосновых насаждений; определение уровня генетически обусловленной изменчивости сосны; выявление адаптированных к условиям произрастания форм и оценка их генетического потенциала; разработка критериев и проведение по ним отбора особей для маточников; в теплице, питомниках и в испытательных культурах оценка семенного потомства по разработанным цитологическим тестам ранней диагностики; разработка рекомендаций по отбору и выращиванию сеянцев и саженцев на генетической основе; разработка долгосрочной программы лесовосстановления в зоне промышленного загрязнения для сохранения и повышения всех функций леса.

Нами начато изучение процессов сексуализации и репродуктивного состояния популяции сосны обыкновенной в зоне действия фторсодержащих промышленных выбросов на различном удалении от Полевского криолитового завода (ПКЗ). Описание пробных площадей, на которых проводились исследования, дано в статье Т.Ф. Коковкиной в данном сборнике. Хромосомная несбалансированность, выявленная нами в процессах микроспорогенеза и митоза в клетках корешков проростков семян сосны, свидетельствует о мутагенном эффекте фторсодержащих выбросов. Морфообразовательные процессы, обусловленные мутациями, проявляются в разновременном наступлении фаз репродук-

тивного развития, в индивидуальной изменчивости плодоношения и семенной продуктивности, в разнокачественности семян и варьировании митотической активности их проростков. Произведенный нами анализ посевных качеств семян, митотической активности проростков, процесса микроспорогенеза у особей с нормальным фенотипом и высоким баллом шишконосности (4...5) показал, что все эти показатели (ни вместе взятые, ни в отдельности каждый) не могут быть диагностическими при отборе (Зуева, Бабушкина, 1991).

В практической деятельности человек ведет отбор на постэмбриональных стадиях, т.е. на диплоидном уровне. Презиготическому отбору на уровне формирования и функционирования половых клеток пока что не уделяют должного внимания. Известно, что гаметная селекция является наиболее целенаправленной, быстрой и выгодной (Демин, Сафронов, 1985; Askew, 1988; Буторина, 1988).

Формирование зиготы, развитие зародыша, семени определяются успехом оплодотворения, который, в свою очередь, зависит от жизнеспособности и полноценности гамет. Мутация в гамете, закрепленная в зиготе, — самый быстрый и последний путь к проявлению ее в фенотипе при доминантном типе наследования. Наиболее доступен для изучения гамет мужской гаметофит на стадии созревшей пыльцы перед пылением.

Для изучения фертильности пыльцы сосны обыкновенной, произрастающей в условиях разной степени загрязнения промышленными выбросами, заложены постоянные пробные площади: ППП 1, ППП 3, ППП 4, ППП 6 в 1,5, 7, 15 и 26 км от ПКЗ соответственно. Микроотробилы фиксировались в уксусно-этиловой смеси Карнуа (1:3) до пыления, в момент и после пыления. Анализировали по 2 микроспорофилла из 3 микроотробил с каждого из 10 модельных деревьев изучаемых ППП.

В процессе формирования мужского гаметофита имели место отклонения от нормального хода развития, отнесенные нами к следующим типам.

1. Пыльцевые зерна (п.з.) среднепопуляционной величины с характерными для вида формой и размерами пыльцевых мешков, имеющие плазмолизированную цитоплазму,

пикнотические и хроматолизированные ядра, фрагментированную цитоплазму и ядро, гомогенную структуру ядра и цитоплазмы, или оптически пустые п. 3.

2. Пыльцевые зерна нормальных размеров с аномальными воздушными мешками (деформированными, кольцевыми, с 1, 3, 4 пыльцевыми мешками или без мешков) и со всеми признаками, перечисленными в п. 1.

3. Мелкие пыльцевые зерна с аномальными морфологическими картинками, представленными в п. 1.

4. Деформированные пыльцевые зерна с неясной морфологической картинкой или пустые.

5. Хромосомные aberrации – дигентрические и отстающие хромосомы, вне веретена деления, хромосомные мосты, агглютинация хромосом, нарушения ориентации веретена деления, многополосность, ассоциации хромосом.

6. Зрелые пыльцевые зерна, не имеющие включений (крахмальных зерен и др.).

7. Асинхронность развития пыльцевых зерен.

8. Остановка в развитии пыльцевых зерен на стадиях микроспорогенеза.

Степень фертильности пыльцы сосны обыкновенной и типы преобладающих нарушений представлены в таблице, опись нарушений дана в порядке снижения их частоты.

Фертильность пыльцы сосны обыкновенной на различном удалении от источника промышленных выбросов

Номер дерева	Доля нормальных пыльцевых зерен, %	Доля аномальных пыльцевых зерен, %	Преобладающий тип нарушений
1	2	3	4

ППП 1

32	98,1	1,9	Пикноз ядра, мелкие пустые п.з., без мешков
63	98,1	1,9	Мелкие, пустые п.з., пикноз ядра

Продолжение

1	2	3	4
64	93,9	6,1	Мелкие п.з., гомогенность и пикноз ядра
65	98,3	1,7	Мелкие п.з. с аномальными мешками, отстающие хромосомы и вне ядра
66	97,9	2,1	Мелкие п.з., пикноз ядра
67	98,8	1,2	Мелкие п.з., пикноз ядра, отстающие хромосомы, нарушение формирования веретена
70а	89,5	10,5	Плазмоллиз цитоплазмы, мелкие п.з., отстающие в развитии (на стадии тетрад)
76	99,2	0,8	Мелкие п.з., аномальные мешки
81	95,1	4,9	Мелкие п.з., деформированные, пикноз ядра
79	97,6	2,4	Мелкие п.з., отстающие хромосомы, мосты
80	97,7	2,3	Плазмоллиз цитоплазмы, пикноз ядра, отстающие хромосомы

ППП 3

10	49,7	50,3	Мелкие п.з., пустые, деформированные с плазмоллизированной цитоплазмой
12	86,7	13,3	Мелкие п.з. с пикнотическим ядром, пустые, деформированные
13	90,8	9,2	Мелкие п.з., пустые, пикноз ядра, остановка развития на стадии диад
15	99,4	0,6	Мелкие п.з., отстающие хромосомы

Продолжение

Номер дерева	Доля нормальных пыльцевых зерен, %	Доля аномальных пыльцевых зерен, %	Преобладающий тип нарушений
1	2	3	4
17	87,8	12,2	Пустые, мелкие п.э., пикноз ядра
2	94,4	5,6	Мелкие п.э., пикноз ядра, п.э. без пыльцевых мешков
3	95,3	4,7	Мелкие п.э., пикноз ядра, деформированные пыльцевые мешки
4	95,8	4,2	Мелкие п.э., пикноз ядра, плазмолиз цитоплазмы, хромосомы вне ядра
6	93,0	7,0	Мелкие п.э., пикноз ядра
ППП 4			
2	94,0	6,0	Пикноз ядра, гомогенность цитоплазмы, деформированные п.э., пустые п.э.
3	60,6	39,4	Пустые п.э., пикноз ядра, деформированные п.э.
5	95,1	4,9	Пикноз ядра, пустые п.э., мосты, отстающие хромосомы
6	84,4	15,6	Пустые п.э., пикноз ядра, гомогенность цитоплазмы, мелкие п.э., плазмолиз цитоплазмы
7	71,5	28,5	Мелкие п.э., пикноз ядра, гомогенность цитоплазмы, остановка в развитии на стадии диад, деформированные п.э., пустые п.э.

Продолжение

1	2	3	4
8	86,5	13,5	Плазмолиз цитоплазмы, пикноз ядра, деформированные п.з.
9	94,9	5,1	Аномальные пыльцевые мешки, пикноз ядра, мелкие п.з.
10	92,5	7,5	Пустые п.з., пикноз ядра, плазмолиз цитоплазмы, деформированные п.з.
11	89,7	10,3	Пустые п.з., пикноз ядра, плазмолиз цитоплазмы, деформированные п.з.
15	92,4	7,6	Пикноз ядра, отстающие хромосомы
ППП 6			
10а	83,1	16,9	Пустые п.з., пикноз ядра, гомогенность цитоплазмы, плазмолиз ее, отставание в развитии на стадии тетрад
10б	77,3	22,7	Пустые п.з., аномальные мешки, пикноз ядра, отставание в развитии на стадии тетрад
11	80,8	19,2	Пустые п.з., мелкие, пикноз ядра, фрагментация цитоплазмы, деформированные п.з., гомогенно окрашенные цитоплазма и ядро, плазмолиз
11а	71,7	28,3	Пустые п.з., гомогенно окрашенные цитоплазма и ядро, пикноз ядра, деформированные п.з., отсутствие включений, плазмолиз, фрагментация цитоплазмы
11б	91,5	8,5	Мелкие п.з., аномальные мешки, деформированные п.з., гомогенно окрашенные цитоплазма и ядро

Продолжение

Номер дерева	Доля нор- мальных пыльцевых зерен, %	Доля ано- мальных пыльце- вых зе- рен, %	Преобладающий тип наруше- ний
12	41,2	58,8	Пустые п.з., пикноз ядра, фрагментация цитоплазмы, гомогенно окрашенные цитоплазма и ядро, плазмолиз цитоплазмы
13	54,9	45,1	Пустые п.з., мелкие, аномальные мешки, фрагментация цитоплазмы, пикноз ядра, гомогенно окрашенные ядро и цитоплазма, отсутствие включений
15	86,2	13,8	Пустые п.з., отсутствие включений, пикноз ядра, гомогенно окрашенные ядро и цитоплазма
15а	88,7	11,3	Отсутствие включений, аномальные мешки, деформированные п.з., пустые п.з., пикноз, фрагментация ядра, гомогенное окрашивание ядра и цитоплазмы, плазмолиз цитоплазмы
17	48,3	51,7	Пустые, мелкие, деформированные п.з., пикноз ядра, отсутствие включений

Стадия распада тетрад считается наиболее критической, очень чувствительной к экзогенным факторам и может сильно сдвигаться под воздействием метеорологических фак-

торов" (Третьякова, 1990) или останавливаться в развитии (Козубов, 1974). Однако остановка развития микроспор на стадии тетрад может быть обусловлена и гипопанеупloidией, т.е. отсутствием тех хромосом, которые несут гены, детерминирующие последующие стадии развития мужского гаметофита. Отставшие и не включенные в ядро хромосомы мы наблюдали в мета- и анафазах мейоза при изучении микроспорогенеза сосны обыкновенной (Зуева, Бабушкина, 1991).

Агглютинация хромосом в фазах деления может быть вызвана самыми различными факторами как экзогенного, так и эндогенного характера: температурой, лучами Рентгена, ультразвуком, химическими веществами, нарушением действия генов и др. (Ригер, Михаэлис, 1967)

Плазмолиз – это явление, обусловленное обезвоживанием цитоплазмы вследствие быстрого перехода цитоплазматической жидкости в межклеточное пространство, которое может быть обратимым и необратимым в зависимости от степени и длительности воздействия фактора, вызывающего плазмолиз.

Обнаружено, что в зрелом пыльцевом зерне сосны количество крахмала может варьироваться в зависимости от типа сексуализации деревьев. У мужских особей более интенсивно идет его накопление, чем у женских, в мелких пыльцевых зернах крахмал совсем отсутствует. Содержание жиров в пыльце, наоборот, коррелирует с ее жизнеспособностью. В стерильной пыльце количество жира наибольшее (Третьякова, 1990).

Выявленное в наших исследованиях отсутствие крахмальных включений в пыльцевом зерне (окраска раствором Люголя) мы отнесли к аномалии, морфологически отражающей генетические изменения и обуславливающей снижение жизнеспособности пыльцы.

Фрагментация ядра и цитоплазмы, по нашему мнению, может быть следствием гиперпанеупloidии. Пикноз ядра – это процесс превращения хроматина в интерфазном или делящемся ядре в гомогенную, сильноокрашающуюся массу под влиянием обработки клеток химическими или физическими агентами. Пикноз интерфазных ядер связан с уплотнением

ядерных коллоидов вследствие потери ими воды (Ригер, Михаэлис, 1967). Хроматолиз ядра — это конечная стадия распада ядра, потеря способности его окрашиваться основными красителями, после разрушения ядерной мембраны происходит смешивание ядерного содержимого с цитоплазмой (Ригер, Михаэлис, 1967). Хроматолиз ядра, как видно по характеру процесса, может быть вызван как химическими, так и физическими факторами внешней среды.

Структурированность ядра и цитоплазмы меняется в процессе формирования мужского гаметофита. Гомогенность (неструктурированность) цитоплазмы и ядра может быть нормой на начальных стадиях развития пыльцы. На поздних стадиях формирования мужского гаметофита дегенерирующие клетки (проталлиальные и др.) теряют структурированность, гомогенно окрашиваются. Клетки, продолжающие онтогенез мужского гаметофита, сохраняют структурированность, характерную для каждой стадии развития пыльцевого зерна.

Дефекты пыльцевых мешков (1, 3, 4 пыльцевых мешка, отсутствие их) при цитологически нормальной пыльце, казалось бы, можно считать не имеющими особого селекционного значения, кроме снижения или увеличения степени летучести пыльцы и связанной с ней возможности перекрестного опыления. Известно, что сам процесс прорастания пыльцы связан с молекулярно-мембранным строением экзины пыльцевого зерна. Стенка (оболочка) пыльцы рассматривается как первичный рецептор и как источник иммобилизованных ферментов, модифицирующих экстраклеточные сигналы. Процессы в цитозоле и в оболочке пыльцевого зерна взаимосвязаны (*Clarke Adrienne et al*, 1985).

Значит, любое изменение пыльцевого мешка может быть использовано в качестве маркера дефектности пыльцы для интерпретации причин ее аномалий и для отбора адаптированных особей.

Степень фертильности пыльцы сосны обыкновенной, произрастающей на различном удалении от источника фторсодержащих выбросов, снижается по мере удаления от источника загрязнения. Наименьшее индивидуальное варьирование степени фертильности наблюдается в насаждении сосны обыкновенной.

новенной в зоне сильного промышленного загрязнения фторсодержащими соединениями (1,5 км), наибольшее - в зоне слабого загрязнения (26 км). Так, фертильность пыльцы сосны обыкновенной на ППП 1 варьируется в пределах 89,6...99,2, на ППП 3 - 49,7...99,4, на ППП 4 - 60,6...95,1, на ППП 6 - 41,2...91,5 %. Причину данного феномена мы видим в более жестком отборе в течение всего периода формирования данных насаждений (30 лет) и элиминации менее адаптированных особей вблизи источника промышленного загрязнения. Если учесть, что среднепопуляционная величина стерильности пыльцы у сосны обыкновенной исчисляется 13 % (0...23 %) (Хазова и др., 1974), то в зоне слабого промышленного загрязнения начинается процесс элиминации неадаптированных особей.

Основными нарушениями процесса формирования пыльцевого зерна у изучаемых модельных деревьев сосны обыкновенной вблизи источника промышленных выбросов (1,5 км) являются мелкие пыльцевые зерна, пикноз ядра, плазмолиз цитоплазмы и хромосомные aberrации (хромосомы отстающие и вне ядра, хромосомные мосты). При удалении от ПКЗ на 7 и 15 км меньше встречается хромосомных aberrаций. В 26 км от ПКЗ спектр нарушений увеличивается, появляются пыльцевые зерна, в которых отсутствуют крахмальные включения, нарушается структурированность цитоплазмы и ядра, которые окрашиваются в этом случае гомогенно, и почти исчезает тип нарушений "хромосомные aberrации".

Анализ типов нарушений формирования мужского гаметофита сосны обыкновенной и частот встречаемости их у отдельных особей позволяет сделать заключение о наличии индивидуальных особенностей у изучаемых модельных деревьев на всех ППП и о тенденции проявления мутагенного и эмбриотоксического эффекта промышленных выбросов. В зоне слабого промышленного загрязнения атмосферы уменьшается мутагенный эффект (отсутствуют физиологические и кластогенные aberrации) и усиливается эмбриотоксический, который приводит к значительному снижению фертильности пыльцы сосны. Процент аномальных пыльцевых зерен у модельных деревьев в зоне сильного

промышленного загрязнения значительно ниже, что свидетельствует об общей адаптационной способности этих особей. Исследование причин и критериев устойчивости деревьев сосны к загрязнениям воздуха показало наличие взаимосвязи между устойчивостью к загрязнению и засухой, между температурой и развитием некрозов под воздействием фтористых соединений. Так, Г.Хольбваш (1988) обнаружил, что в условиях высоких температур в большей степени выражены симптомы некроза хвои и аккумуляции фтора в тканях корней. Ф.Д. Сказкин (1971) выявил плазмоллизированную пыльцу у растений при воздушной и почвенной засухе. А.Б. Сунцов (1987) отмечает увеличение частоты хромосомных aberrаций при неблагоприятных метеорологических условиях. Наблюдаемый нами в 1991 г. по сравнению с 1990 г. более сильный эмбриотоксический эффект можно объяснить сложными метеорологическими условиями (резким колебанием температуры воздуха днем и ночью, резкой сменой теплых дней с температурой до 29 °С холодными в период прохождения стадий мейоза и формирования мужского гаметофита), которые усилили негативное влияние промышленных выбросов. Однако в результате исследования репродуктивного состояния сосны в зоне промышленного загрязнения выявлено, что степень и типы аномалий микроспорогенеза и структуры пыльцевого зерна сильно варьируются у особей в пределах одной ППП, что дает возможность отбора более устойчивых форм.

Последующее изучение репродуктивного состояния модельных деревьев (опыляющей и оплодотворяющей способности пыльцы, формирование семян, посевных качеств и жизнеспособности их проростков) позволит более полно охарактеризовать их и ввести адаптированные формы в селекционный процесс для лесовосстановления в зоне промышленного загрязнения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Буторина А.К. Использование цитогенетического метода в селекции лесных древесных растений // Развитие ге-

нетики и селекции в лесохозяйственном производстве. М., 1988. С. 20–22.

Демин Ю.С., Сафронов Л.Д. Презиготический отбор//Успехи современной генетики. М., 1985. С. 202–244.

Зуева Г.В., Бабушкина Л.Г. Использование цитозембриологических методов для оценки адаптивности вида в условиях промышленного загрязнения//Вклад ученых и специалистов в развитие химико-лесного комплекса. Свердловск, 1991. С. 28–29.

Козубов М.Г. Биология плодоношения хвойных на Севере. Л., 1974. 136 с.

Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитологический словарь. М., 1967. 607 с.

Сказкин Ф.Д. Критический период у растений по отношению к недостатку воды в почве. Л., 1971. 150 с.

Сунцов А.Б. Спонтанные мутации сосны обыкновенной как проявление индивидуальной генетической пластичности хвойных//Гез. докл. 5 Всесоюз. съезда ВОГиС им. Н.И. Вавилова, 24–28 нояб. М., 1987. Т. 4. Ч. 4. С. 219.

Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. Новосибирск, 1990. 157 с.

Хазова И.И., Свицкова В.С., Ковешникова Н.М. Отбор опылителей в природных популяциях и на клоновых плантациях сосны по качеству пыльцы//Состояние и перспективы лесной генетики, селекции и семеноводства. Рига, 1974. С. 256–262.

Хольбваш Г. Реакция организмов высших растений на загрязнение атмосферы двуокисью серы и фторидами//Загрязнение воздуха и жизнь растений. Л., 1988. С. 206–246.

Askew G. R. Estimation of gamete pool compositions in clonal seed orchards. // Silval Genet. 1988. v.37. №5–6. p. 227–232.

Clarke Adrienne F., Anderson M.A., Harris Ph. J., Mau Shaio-Lim. Molecular basis of all recognition during fertilization in higher plants. // J. Cell Sci. 1985. v. 78. №2. p. 261–285.