

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© Н.Е. Носкова, И.Н. Третьякова

УДК 581.3:581.143.036...04.632.15:582.475

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, СибГТУ, КГУ, г. Красноярск, Россия

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Проект № 02 - 04 - 48168).

В условиях техногенеза и изменившегося в последние годы климата в окрестностях г. Красноярска микроспорогенез у сосны обыкновенной начинался осенью, и материнские клетки микроспор зимовали в состоянии профазы I (по типу *Larix*). Редукционное деление в них завершалось в начале мая следующего года, асинхронно, с многочисленными нарушениями. Кроме того, подавляющая масса микроспор сосны не проходила проталлиальных делений. В результате пыльца оставалась одноклеточной, не способной формировать пыльцевые трубки и прорасти на питательных средах. Пыльца, прошедшая митотические деления, была в основном низкого качества и формировала короткие пыльцевые трубки. Формирование пыльцы низкого качества вело к слабому опылению и обусловило низкую семенную продуктивность и урожайность шишек в исследуемые годы.

Under the technogenic pollutants and the recent changing climate at the Krasnoyarsk region microsporogenesis of Scotch pine started in fall and microspore mother cells wintered at the prophase I stage (according to the type *Larix*). Their reduction division finished at the early May of the following year asynchronously with many disturbances. Moreover, majority microspores did not undergo prothallial divisions. As result, pollen remained mononuclear not able to form pollen tubers and to germinate at the nutrient media. Pollen went the mitotic division completely had, mainly, poor quality and formed short pollen tubers. Bad pollen development resulted in weak pollination and low seed productivity and poor cone yield during studied years.

Реакция растений отдельных видов на экологический стресс генетически детерминирована и отражает конкурентоспособность, адаптивные возможности и устойчивость к неблагоприятным воздействиям природных и антропогенных факторов этих видов

(Щербатюк и др., 1999). Стрессовые условия окружающей среды оказывают глубокое воздействие на репродуктивные способности сосны обыкновенной. Ведущая роль при этом принадлежит неблагоприятным погодноклиматическим условиям. Однако воздушные поллютанты оказывают заметное влияние на

генеративные органы сосны (Подзоров, 1965; Шкарлет, 1974; Антипов, Болотов, 1977; «Лесные экосистемы...», 1990; Осколков, 1999, 2003; Федотов и др., 1983; Benoit et al., 1983; Keller, Beda, 1984; Федорков, 1991, 1999; Третьякова и др., 2001; Носкова и др., 2002; Третьякова, Носкова, 2004 и др.).

Красноярск является одним из крупнейших промышленных центров Сибири. В связи с ухудшением экологической обстановки, вызванной загрязнением среды веществами техногенного происхождения, повреждение сосновых лесов в окрестностях Красноярского мегаполиса становится весьма актуальным. Кроме того, значительные изменения погодно-климатических условий, для которых характерны также относительно высокие положительные температуры весной, продолжительные теплые осени и теплые мягкие зимы, наблюдаются в последние годы в Красноярском регионе. Процессы полового размножения хвойных растений, в том числе микроспорогенез и формирование мужского гаметофита, представляют собой четко отработанные программы развития и имеют видоспецифический характер. Кроме того, годичный цикл развития лесных древесных видов адаптирован к местным температурным условиям (Sarvas, 1967).

Каким образом могли повлиять особенности окружающей среды, сложившиеся в последние годы в окрестностях г. Красноярска, имеющие, несомненно, стрессовый характер, на репродукцию сосны обыкновенной, в частности, на процессы формирования мужского гаметофита, попытались выяснить авторы данной статьи.

Материал и методика

Объектом исследования послужила сосна обыкновенная, произрастающая в районах с разным уровнем техногенной нагрузки (таблица 1). Сбор образцов проводился регулярно у 20 - 25 деревьев в каждом древостое. Для изучения особенностей процессов микроспорогенеза и формирования пыльцы (п. Березовка) собирались почки мужских побегов в осенне-зимний период и ранней весной 1-2 раза в месяц, а также почки мужских побегов и микростробилов в период мейотических делений и формирования пыльцы. Для характеристики морфологических особенностей и качества пыльцы (накопление крахмала в пыльцевом зерне, прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок) собиралась пыльца в период пыления. Для оценки урожая проводился сбор зрелых женских шишек.

Таблица 1 - Уровень загрязнения территорий исследуемых древостоев сосны обыкновенной (по «Нормированный...», 1998)

| Место произрастания древостоя | Уровень загрязнения территории | Пылевая нагрузка (Po), г/км ² .сут. | Загрязнение элементами-токсикантами (Zn, W, Si, Mo, Cu, Sn, Co, Pb, Ni, Hg) | |
|---|---|--|---|-------------|
| | | | снег, Zee | почва, Zen |
| п. Березовка | Зона очень высокого, чрезвычайно опасного аэрогенного геохимического загрязнения | более 800 | более 256 | более 128 |
| Академгородок | Граница высоко опасного и среднего, умеренно опасного аэрогенного геохимического загрязнения | 625 | 128-256 | 32-128 |
| Погорельский ОЭП (38 км от г.Красноярска) | Граница среднего, умеренно опасного и низкого неопасного аэрогенного геохимического загрязнения | 350 | 64-128 | 16-32 |
| пл. Бадаложный | Фоновый древостой | менее 350 | менее 64-128 | менее 16-32 |

Для изучения мейоза и микрогаметофитогенеза образцы фиксировались в спиртово-уксусной смеси (Паушева, 1980), готовились временные цитологические препараты. При этом микростробилы, помещались в раствор 1н. HCl (для мацерации) на 10 - 15 мин, затем промывались в дистиллированной воде и окрашивались: ацетогематоксилином по Ю.А.Смирнову (1968), кармином по Гренахеру (Фрайштат, 1980) или сафранином (Паушева, 1980) с разными модификациями. На препаратах определяли фазы мейоза, отмечали типы отклонений. Для одного срока фиксации готовились препараты не менее чем с 10 микростробилов.

Из образцов пыльцы, собранной во время пыления, готовились цитологические препараты, на которых определялись морфометрические показатели пыльцевого зерна: длина и высота тела и воздушных мешков; проводился анализ аномалий пыльцевых зерен. Содержание крахмала в пыльце измеряли в растворе Люголя по интенсивности окрашивания в 3 - балльной

системе (Третьякова, 1990). Для проращивания пыльцы использовались 15%-й раствор сахарозы, а также минеральная среда, приготовленная по Нигаарду (Nygaard, 1969), и среда MS (Murashige and Scrooge, 1962): пыльца помещалась во влажную камеру, температурный режим (26°C) поддерживался в условиях термостата. Через 6-7 дней производился учет числа проросших пыльцевых зерен (%) и измерялась длина пыльцевых трубок (мкм). Цитологические исследования проводились на микроскопе МБИ-6.

При оценке урожая измерялись высота и диаметр женских шишек, подсчитывались число развитых и неразвитых чешуй, общее число чешуй, число семян. Семенная продуктивность макростробилов рассчитывалась по формуле (Минина, Третьякова, 1983)

$$P = n/2N * 100\%$$

где P - семенная продуктивность макростробилов; n - общее количество семян; N - общее число чешуй.

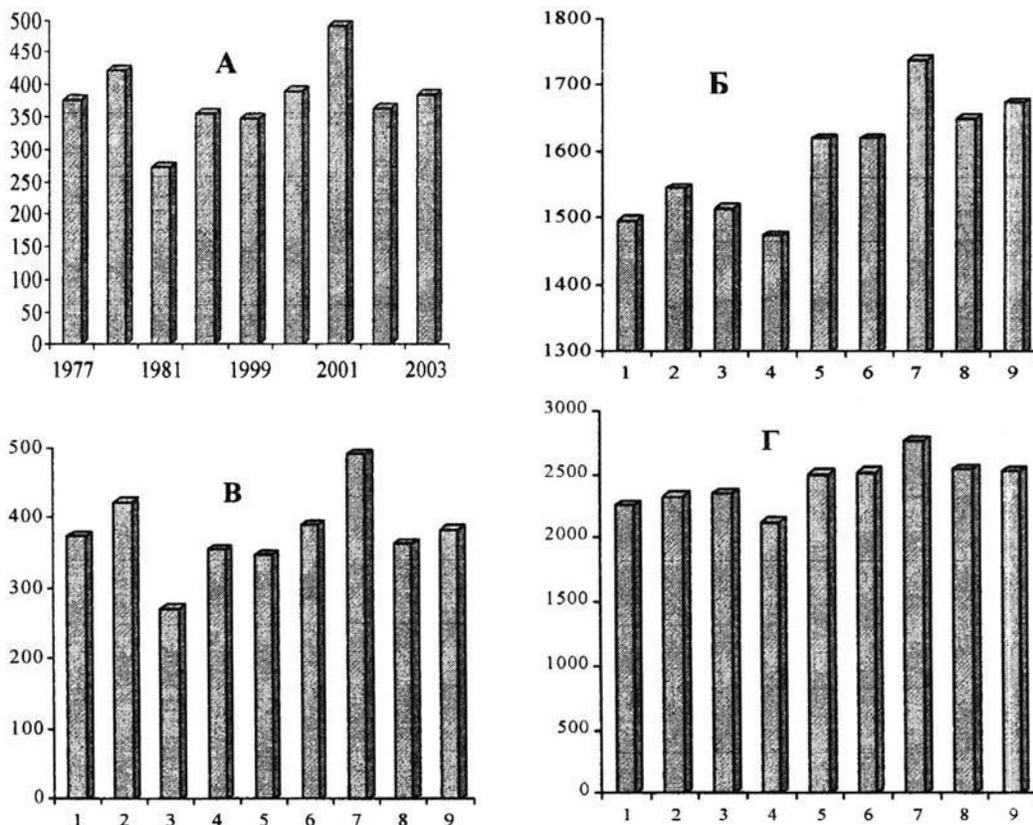


Рисунок 1 - Суммы положительных температур в г. Красноярске:
 А - в весенние месяцы; Б - в летние месяцы; В - в осенние месяцы;
 Г - общегодовая сумма положительных температур
 (1-1977; 2-1978; 3-1981; 4-1983; 5-1999; 6-2000; 7-2001; 8-2002; 9-2003)

Определяли качество семян рентгенографическим методом (Семена..., 1988) и вес тысячи семян.

Статистическую обработку экспериментального материала проводили по общепринятой методике (Рокицкий, 1973), с использованием пакета прикладных компьютерных программ "Microsoft excel".

Результаты и обсуждение

Формирование пыльцы. У сосны обыкновенной процесс формирования микроспорофиллов заканчивается во второй половине лета, процессы микроспорогенеза и формирования пыльцы протекают весной следующего года: при повышении среднесуточных температур в результате высокой митотической активности клетки археспория дифференцируются, в микроспороцитах идут мейотические деления, формируются пыльцевые оболочки, микроспоры претерпевают три проталиальных деления. В результате, зрелое пыльцевое зерно (мужской

гаметофит) сосны обыкновенной имеет генеративную и вегетативную клетку. Вегетативная клетка формируется при прорастании в пыльцевую трубку. Пыление в условиях Сибири проходит, как правило, в начале - середине июня при сумме эффективных температур 224 - 253. 6 град.-дней.

Однако с 2001 г., в связи с заметным потеплением (рисунок 1), характерной особенностью для особей этого вида, произрастающих в окрестностях г. Красноярск, стало вступление в процесс микроспорогенеза осенью, в октябре. К этому времени в микроспорангиях сосны обыкновенной происходила дифференциация клеток археспория в микроспороциты, которые, подобно *Larix* зимовали в состоянии ранней профазы I. Весной, с установлением среднесуточной температуры выше +5°C, редукционные деления у сосны протекали с минимальным накоплением эффективных температур (таблица 2).

Таблица 2 - Динамика мейоза у сосны обыкновенной в условиях Красноярской лесостепи

| Год | Дата прохождения мейоза, май | Сумма эффективных температур (град.-дни) |
|----------------------------------|------------------------------|--|
| 1977 (Третьякова, 1990) | 15-22 | 72 |
| 1978 (—''—) | 22-27 | 60,8 |
| 1981 (—''—) | 14-17 | 69,6 |
| 1983 (—''—) | 23-28 | 76,7 |
| 2001 (Носкова, Третьякова, 2003) | 10-11 | 48,5 |
| 2002 (—''—) | 10-11 | 57,6 |
| 2003 | 10-15 | 60,5 |

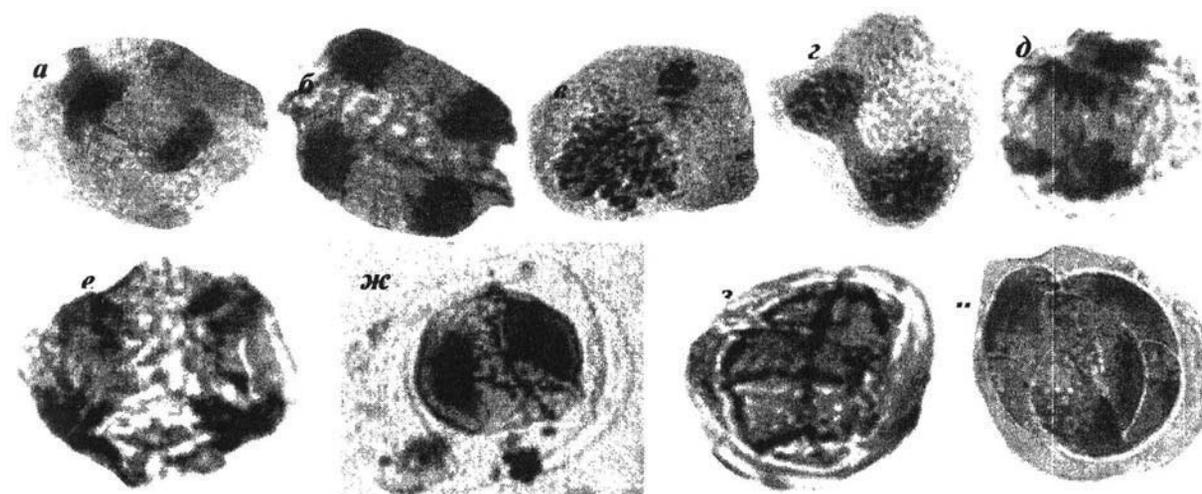


Рисунок 2 - Мейотические нарушения в микроспороцитах сосны обыкновенной: а - мосты; б - параллельное расположение веретена деления; в - неравномерное распределение генетического материала (телофаза I); г - цитомиксис в диаде; д, е - расщепление полюсов в ходе первого (д) и второго (е) деления; з, и - гексады микроспор. (Ок. х7; Об. х60)

Процессы редукционного деления находятся в значительной зависимости от погоды, и в условиях высоких положительных температур и низкой влажности 2001, 2002 и 2004 гг. проходили стремительно - за 1-2 дня. Похолодание и атмосферные осадки в 2003-2004 гг. вызывали задержку мейотических событий: в 2003 г. - первое деление мейоза продолжалось с 10 по 14 мая, а в 2004 г. - 15 мая только началось. Микроспорогенез проходил асинхронно, с многочисленными нарушениями (до 40%), в том числе связанными с нарушением функций ахроматинового веретена с образованием диад, триад, пентад и гексад, ранним цитокинезом с последующей деградацией диад, цитомиксисом и др. (рисунок 2).

Примерно у 36% мейоцитов во втором делении наблюдалось параллельное расположение ахроматинового веретена, что является предпосылкой для образования микроспор с нередуцированным числом хромосом (Буторина и др., 1985).

Образование гипертрофированной пыльцы с нередуцированным набором хромосом особенно характерно для 2001 г. Мейотические нерегулярности вели к деградации мейоцитов на разных стадиях развития (до 29-32%), к образованию многочисленных аномалий пыльцы. Мейоз заканчивался образованием тетрад микроспор.

В постмейотический период тетрады освобождаются от каллозной оболочки, проходят важные процессы формирования покровов пыльцевого зерна, воздушных мешков и подготовки к проталлиальным делениям. Проталлиальные деления у сосны обыкновенной, как правило, начинаются за 1 - 2 дня до начала пыления. В данных исследованиях в образцах зрелой пыльцы, собранной во время пыления, наблюдалось значительное количество пыльцы, не прошедшей митотических делений, а именно, одноклеточная пыльца и пыльцевые зерна, с одной или несколькими проталлиальными клетками (рисунок 3).

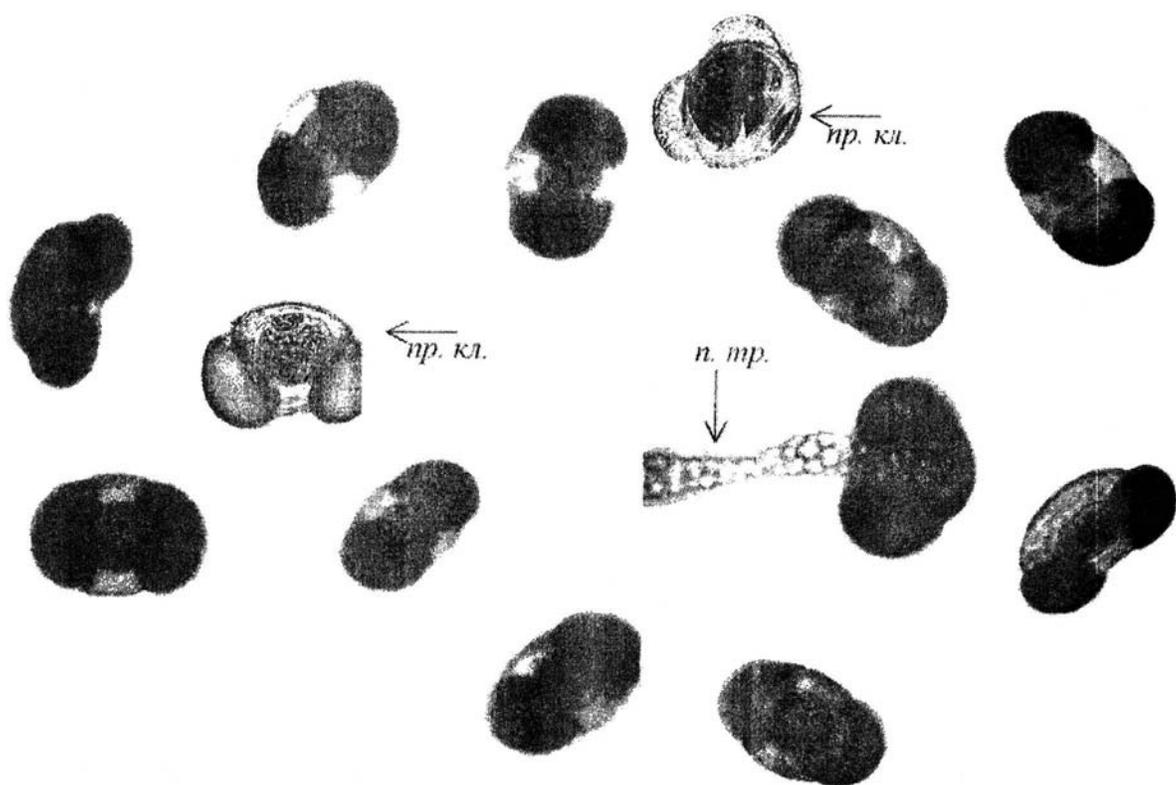


Рисунок 3 - Одноклеточная пыльца сосны обыкновенной (*пр. кл.* - проталлиальная клетка; *п. тр.* - пыльцевая трубка). (Ок. $\times 7$; Об. $\times 20$)

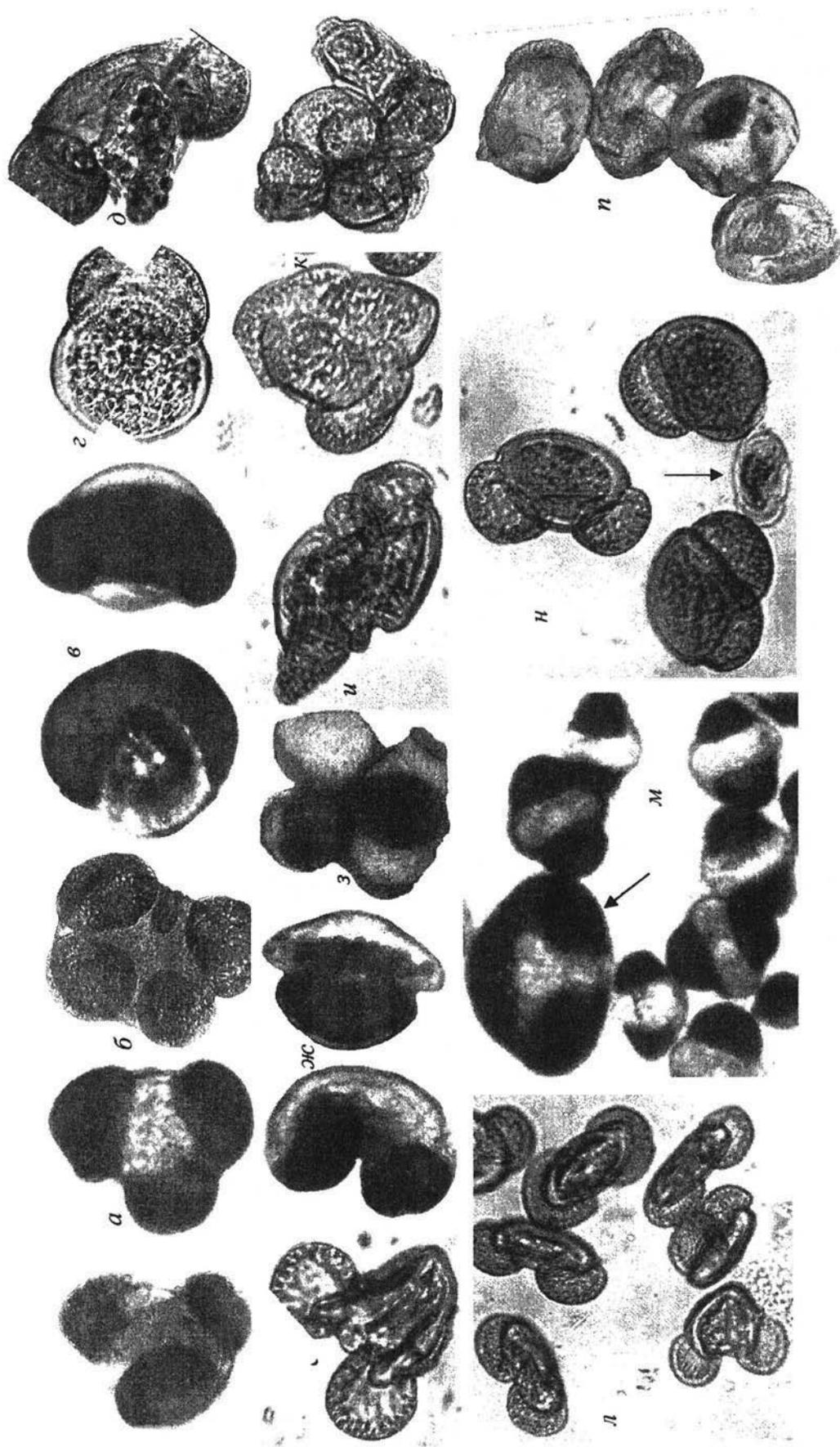


Рисунок 4 - Аномалии пыльцы сосны обыкновенной:

а - пыльцевое зерно с тремя воздушными мешками; б - диплоидное пыльцевое зерно с четырьмя воздушными мешками; в - воротничковое пыльцевое зерно; г, д - пыльцевые зерна с деформациями оболочки; е, ж, л - пыльцевые зерна с деформациями тела и мешков (ж - линзовидное пыльцевое зерно); з-к - сросшиеся пыльцевые зерна; м - мелкое пыльцевое зерно (показано стрелкой); н - гипертригональное (диплоидное) пыльцевое зерно (показано стрелкой), п - деградирующая пыльца. (Ок. x7; Об. x20)

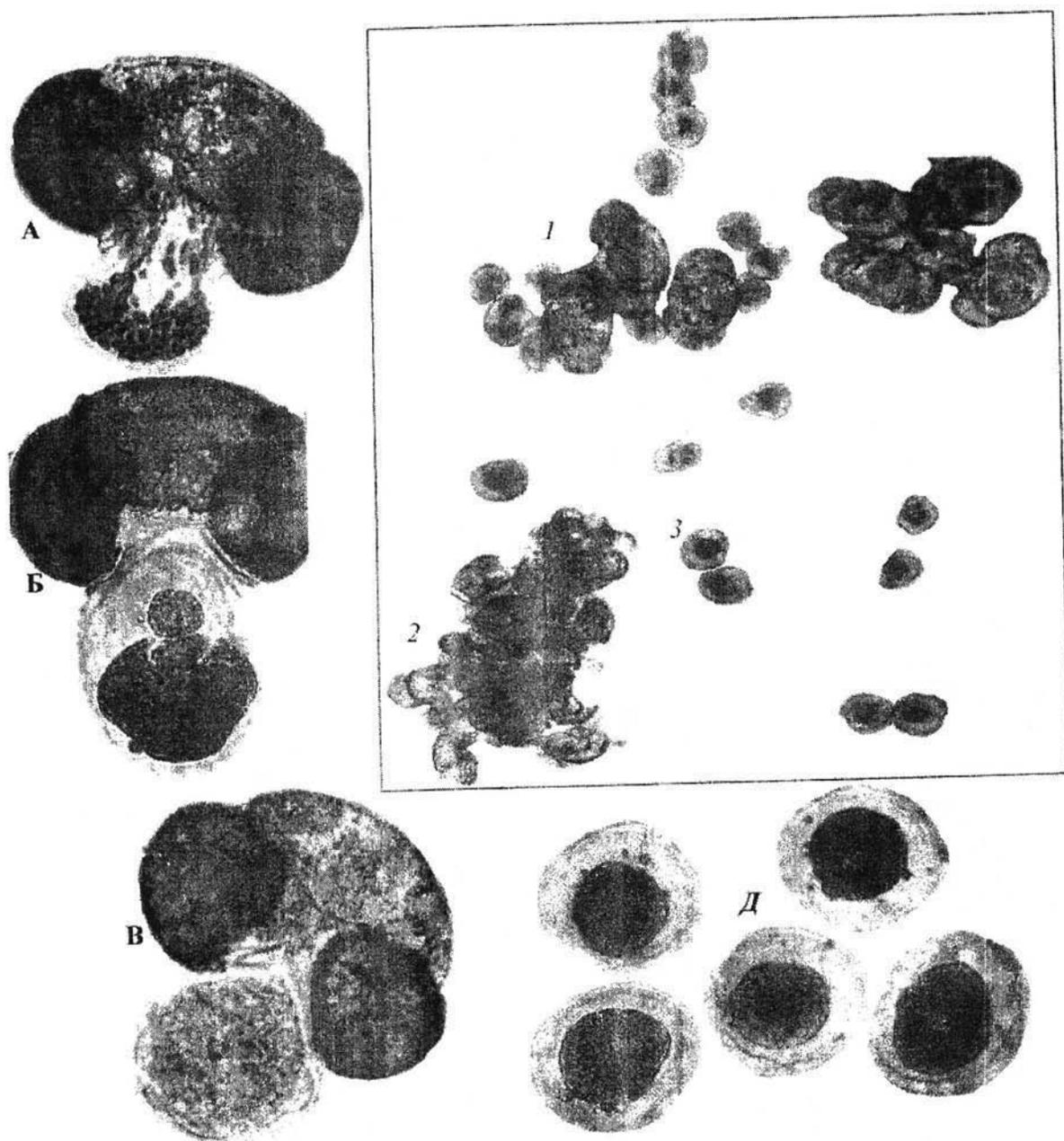


Рисунок 5 - Поведение пыльцы сосны обыкновенной в суспензионной среде *in vitro*:

А - двухклеточное пыльцевое зерно, формирующее трубку;

Б - выход содержимого пыльцевого зерна с антеридиальной и двумя проталлиальными клетками в суспензию;

В - выход содержимого из одноклеточного пыльцевого зерна. (Ок. x7; Об. x20);

Г: 1 - пыльцевые зерна в суспензии, 2 - оболочки пыльцевых зерен после выхода клеток в раствор; 3 - отдельные клетки из пыльцевых зерен в растворе. (Ок. x7; Об. x8);

Д - отдельные клетки из пыльцевых зерен в растворе. (Ок. x7; Об. x20)

Качество пыльцы. Пыление сосны зависело от погодно - климатических особенностей сезона и проходило, из-за смещения сроков мейоза, несколько раньше по сравнению с предыдущими годами (таблица 3).

Средние значения размеров пыльцы у сосны из разных пунктов произрастания составили близкие величины и практически

не отличались от данных многолетних исследований (39-42 мкм, Минина, Третьякова, 1983; Третьякова, Носкова, 2004).

Нарушения в ходе мейоза и формирования пыльцы обусловили многочисленные (до 30-80%) аномалии пыльцевых зерен (рисунок 4).

Таблица 3 - Динамика пыления у сосны обыкновенной в условиях Красноярской лесостепи

| Год | Пыление | |
|----------------------------------|---------|-------|
| | май | июнь |
| 1977 (Третьякова, 1990) | | 10-14 |
| 1978 (—''—) | | 10-15 |
| 1981 (—''—) | 27-30 | |
| 1983 (—''—) | | 15-20 |
| 1999 (Носкова, Третьякова, 2003) | | 2-9 |
| 2000 (—''—) | | 10-14 |
| 2001 (—''—) | 25-31 | |
| 2002 (—''—) | 25-31 | |
| 2003 | 30- | -6 |
| 2004 | 29- | -1 |

Содержание крахмала и способность пыльцевых зерен прорасть на искусственных средах проявили прямую зависимость показателей жизнеспособности пыльцы сосны обыкновенной от уровня загрязнения древостоя, что особенно видно в годы, наиболее благоприятные для развития пыльцы.

Так, 1999 и 2002 гг. прорастание пыльцевых зерен из техногенных районов в среднем составило 45 - 56 %, тогда как в фоновом древостое - 73 - 79 %, а длина пыльцевых трубок - 64 и 117,5 мкм,

соответственно. В 2001 и 2003 гг. получены низкие показатели прорастания пыльцевых зерен: мужские гаметофиты формировали, в основном, короткие пыльцевые трубки, которые быстро лизировали. При этом цитоплазма вегетативной клетки часто не заполняла пыльцевую трубку полностью, а располагалась у апикального конца последней, соединяясь с содержимым пыльцевого зерна тонким цитоплазматическим тяжом, по которому ядро вегетативной и генеративной клетки не могли спуститься в трубку.

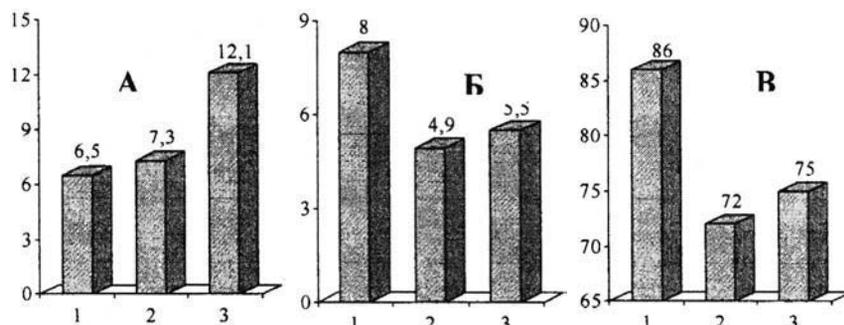


Рисунок 6 - Структура урожая шишек сосны обыкновенной (2000):

А - семенная продуктивность макростробилов;

Б - вес 1000 семян; В - качество семян.

(1 - п. Березовка; 2 - Погорельский ОЭП; 3 - ст. Бадаложная)

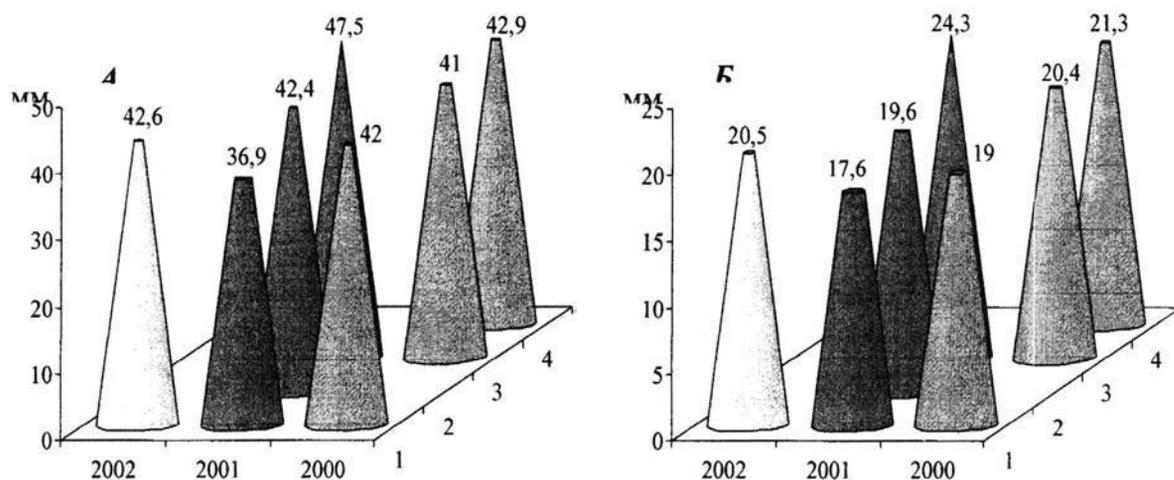


Рисунок 7 - Параметры женских шишек сосны обыкновенной:

А - длина; Б - диаметр

Пыльца 2000 и 2004 гг. оказалась полностью стерильной и содержала, одноклеточные пыльцевые зерна и пыльцу с проталиальными клетками. Такая пыльца, не прошедшая или не завершившая проталиальные деления, не способна формировать пыльцевые трубки и, следовательно, прорасти на питательных средах. В условиях *in vitro* (на минеральной среде) оболочки одноклеточных пыльцевых зерен и пыльцевых зерен с проталиальными клетками через 7 - 10 дней разрывались и клетки выходили в питательный раствор (рисунок 5).

Структура урожая шишек. Пыльца низкого качества, формировавшаяся под воздействием поллютантов и в условиях неблагоприятных погодных-климатических факторов, оказала заметное негативное влияние на структуру урожая женских шишек сосны обыкновенной. Исследования показали, что с увеличением уровня загрязнения размеры шишек уменьшались, увеличивалось количество неразвитых чешуй, уменьшалось число семян в шишке, снижалась семенная продуктивность макростробилов (полнозернистость и вес 1000 семян при этом, наоборот, увеличивались, рисунок 6). На следующий год после формирования стерильной пыльцы (2001) шишки на деревьях во всех районах исследования формировались в небольшом количестве (на отдельных деревьях - менее десятка) и характеризовались более низкими показателями структуры урожая по сравнению с годами, когда развитие

макростробилов шло после опыления пыльцой лучшего качества (рисунок 7).

Таким образом, экологический стресс оказывает заметное влияние на репродуктивные процессы сосны обыкновенной. Так, формирование пыльцы у сосны обыкновенной в условиях техногенеза и изменившегося в последние годы климата имело свои особенности: мейоз начинался осенью, и микроспороциты зимовали в состоянии профазы I (по типу Larix). Мейотические деления весной проходили с минимальным накоплением эффективных температур.

В условиях техногенеза, а также в связи с воздействием низких зимних температур в период ранней профазы I мейоза, микроспорогенез у сосны проходил с высоким уровнем нарушений, происходило блокирование митотических делений в микроспорах. В результате формировалась пыльца низкого качества с большим количеством аномалий, в том числе одноклеточная пыльца, неспособная формировать пыльцевые трубки. Опыление макростробилов пыльцой низкого качества обусловило низкую семенную продуктивность и урожайность шишек в исследуемые годы.

Библиографический список

1. Антипов, В.Г., Болотов, Н.А. Отношение видов пихты к загрязнению промышленными газами. // Защитное лесоразведение и лесные культуры. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1977. - Вып. 4. - С. 15-21.

2. Новый тип мейотической мутации у сосны / А.К. Буторина [и др.] // Генетика. 1985. Т. XXI. № 1. С. 103-111.
3. Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. / под. ред. В.А. Алексеева. - Л.: Наука, 1990. - 200 с.
4. Минина, Е.Г., Третьякова, И.Н. Геотропизм и пол у хвойных. // Новосибирск, СО АН СССР, 1983. 199 с.
5. Нормированный по экологической опасности зональный ореол аэрогенного геохимического загрязнения Красноярской агломерации. Карта ЦМС Красноярского УГМС. - Красноярск, 1998.
6. Особенности мужской генеративной сферы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях экологического стресса/ Н.Е. Носкова [и др.] // II Междунар. конф. по анатомии и морфологии растений: тез. докл. СПб, 2002. - С. 300-301.
7. Осколков, В.А. Качество пыльцы сосны обыкновенной в древостоях Приангарья при разном уровне загрязнения // Лесоведение. 1999 № 2. С. 16-21.
8. Осколков, В.А., Воронин, В.И. Репродуктивный процесс сосны обыкновенной в Верхнем Приангарье при техногенном загрязнении // Иркутск: Изд.-во Иркут. гос. ун-та, 2003. - 140 с.
9. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений // М.: Колос. 1980. 304 с.
10. Подзорнов, Н.В. Влияние задымления воздуха на качество семян сосны обыкновенной // Лесное хозяйство. 1965. - № 7. - С. 47-49.
11. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1973. 320 с.
12. Семена древесных пород, методы рентгенографического анализа. ОСТ 56-94-87 // 1988. - 23 с.
13. Смирнов, Ю.А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом. // Цитология. 1968. - № 2.
14. Форма кроны и пыльцевая диагностика - параметры стрессового состояния сосны обыкновенной в условиях техногенного загрязнения г. Красноярска и его окрестностей / И.Н. Третьякова [и др.] // Мат-лы X международного симпозиума «Концепция гомеостаза: теоретические, экспериментальные и прикладные аспекты». - Новосибирск: Наука, 2001. - С. 148-152.
15. Третьякова, И.Н. Эмбриология хвойных // Новосибирск, «Наука», 1990. 157 с.
16. Третьякова, И.Н., Носкова, Н.Е. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса // Экология. - 2004. № 1. - С. 1-8.
17. Федорков, А.Л. Изменение в мужской генеративной сфере сосны при аэротехногенном загрязнении // Эколого-географические проблемы сохранения и восстановления лесов Севера. Архангельск, 1991. - С. 296.
18. Федорков, А.Л. Адаптация хвойных к стрессовым условиям Крайнего Севера. Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 97 с.
19. Оценка действия двуокиси серы на сосновые насаждения / И.С. Федотов [и др.] // Лесоведение. - 1983. - № 6. - С. 23-27.
20. Фрайштат, Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии: справочник // М.: Химия. 1980. 480 с.
21. Шкарлет, О.Б. Влияние дымовых газов на формирование репродуктивных органов сосны обыкновенной (на примере одного медеплавильного предприятия Урала) // автореф. дис. ... канд. биол. наук. Свердловск, 1974. - 27 с.
22. Видовая специфичность реакции фотосинтеза хвойных на факторы среды / А.С. Щербатюк [и др.] // Лесоведение. 1999. - № 5. - С. 41-49.
23. Benoit, L.F., Scelly, J., Moora, L.D. The influence of ozone on *Pinus strobus* L. Pollen germination // Can. J. Forest Res. 1983. - V. 13. № 1. - P. 184-187.
24. Keller, T., Beda, H. // Effect of SO on the germination of conifer pollen // Environment Pollut. 1984. - V. 33. - № 3. - P. 237-243.
25. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant., 1962. - V. 15. - N 4. - P. 473-497.
26. Nygaard, P. Studies in the germination of pine pollen (*P. mugo*) in vitro 1. Growth conditions and effects pH and temperature on germination, tube growth and respiration // Physiol. Plant. 1969. - V. 22. - № 3. - P. 338-346.
27. Sarvas, R. The annual period of development of forest trees. Proc. of Finnish Acad. of Sci. and Letters. Helsinki, - 1967.

Поступило в редакцию 1 апреля 2005 г.

Рецензия от 24 апреля 2005 г.