

Исследование мужской генеративной сферы как способ определения перспективности интродуцированных видов

М. Ю. Чугреев – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, младший научный сотрудник – Воронежский государственный университет, michael.yurievich@yandex.ru

Л. М. Стародубцева – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, научный сотрудник

*Приводятся результаты исследований зависимости жизнеспособности пыльцы ели колючей ф. голубой (*Picea pungens* f. *glauca* Engelm.) от условий произрастания, уровня техногенного загрязнения и температуры проращивания.*

Ключевые слова: *ель колючая ф. голубая, хвойные интродуценты, генеративная сфера, пыльца, техногенное загрязнение, засуха.*

Ель колючая форма голубая (*Picea pungens* f. *glauca* Engelm.) – интродуцент родом из Северной Америки. Благодаря строго ярусной архитектуре кроны и серебристо-голубой окраске хвои это дерево давно и успешно используется для озеленения улиц, садов и парков разных городов, в том числе и Воронежа.

Воронеж расположен в лесостепной зоне Центрального Черноземья, которая характеризуется засушливостью климата. Это – отрицательный экологический фактор, нарушающий интенсивный процесс семеношения, он несвойственен ареалу ели колючей формы голубой. В засушливые годы растения испытывают стресс от повышенной температуры воздуха и дефицита влаги. Особенности генеративного развития хвойных интродуцентов, формирования пыльцы, причины низкого качества семян, влияние факторов внешней среды в условиях лесостепной зоны, в том числе в условиях техногенного загрязнения, изучены недостаточно [1–4]. Н. В. Вехов отмечал, что даже в годы исключительных засух во многих городах степной зоны парковые культуры ели колючей показали высокую устойчивость и почти не снизили прирост [1]. Это дерево в городских условиях достаточно устойчиво к воздействию пыли и вредных газов.

Хвойные интродуценты, произрастая за пределами своего ареала, вынуждены адаптироваться к климатическим условиям лесостепной зоны. Их экологический потенциал по сравнению с местными видами существенно снижен, поэтому генеративная сфера более чутко откликается на состояние и изменение природной среды. Одним из важнейших показателей успешности адаптации интродуцентов является их способность образовывать всхожие семена, обеспечивая дальнейшее размножение вида в новых условиях. Для определения экологического потенциала и способности к акклиматизации *Picea pungens* проведены работы по анализу качества пыльцы с учетом погодных условий.

Цель работы – изучить особенности развития генеративной сферы ели колючей формы голубой, определить жизнеспособность пыльцы методом проращивания *in vitro*, а также оценить

влияние на эти характеристики места произрастания и метеорологических условий вегетационного периода.

Задачи исследования:

✓ Определить жизнеспособность пыльцы ели колючей *in vitro* и характер роста пыльцевых трубок в зависимости от условий произрастания деревьев, продуцирующих пыльцу, и уровня техногенного загрязнения места произрастания.

✓ Выявить изменение уровня жизнеспособности пыльцы и длины пыльцевых трубок изучаемого вида под влиянием изменения (повышения или понижения) температуры проращивания, а также зависимость от условий формирования, выявить аномалии в развитии пыльцы.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов были выбраны:

1) деревья с желтой и красной окраской микростробиллов, произрастающие на семенных участках ели колючей ф. голубой в Экспериментально-показательном дендрарии ВНИИЛГИС-биотех (далее – дендрарий), расположенном в экологически чистом районе города; возраст деревьев – 36 лет;

2) деревья с желтой окраской микростробиллов, произрастающие в аллеиных посадках ели колючей ф. голубой на улицах Железнодорожного района, одного из самых загрязненных в Воронеже, с высокой интенсивностью движения автотранспорта; возраст деревьев – 25–30 лет.

Фенологические наблюдения за развитием генеративной сферы проводили по методике Н. Е. Булыгина [5]. Характеристика метеорологических условий базируется на данных Воронежской гидрометеорологической службы.

Сбор пыльцы осуществляли в начале пыления. Образец каждой пробы представлял собой смесь пыльцы нескольких микростробиллов. Микростробиллы просушивали при 22–27 °С в бумажных пакетах, затем просеивали через мелкоячеистые сита. Пыльцу в стеклянных пробирках с ватными пробками помещали в эксикатор с хлористым кальцием и хранили в холодильнике при

температуре $+2...+5$ °С до проращивания *in vitro*.

Эмбриологические исследования проводили по общей методике определения жизнеспособности пыльцы растений [6].

Пыльца проращивалась при различных температурах в условиях термостата в чашках Петри на питательной среде, содержащей агар, сахарозу и борную кислоту. Уровень прорастания *in vitro*, как показатель жизнеспособности пыльцы, устанавливали по результатам проращивания в течение 72 ч при температуре 27 °С, которая является стандартной при тестировании жизнеспособности [7], а также при повышенном (35 °С) и пониженном (18 °С) температурном режиме. Перед анализом препараты проросшей пыльцы окрашивали раствором Люголя для выявления уровня содержания крахмала. Анализ опытных образцов проводили с помощью микроскопа «Primo Star» при увеличении 4×16 и 10×16 . Фото съемка осуществлялась фотоаппаратом «Canon EOS 1000D» с программным обеспечением «EOS Utility». При этом учитывали число проросших пыльцевых зерен. Длину пыльцевых трубок определяли по фотоснимкам при помощи программы «AxioVision SE64 Rel.4.8». Статистическую обработку проводили с использованием программного продукта Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

В 2013 г. вегетационный период начался в обычные для региона сроки – в первые числа апреля. Весна была дружная и без возвратных холодов. В течение апреля температурный режим соответствовал региональной норме. Во второй декаде апреля среднедекадная температура воздуха превысила порог 10 °С, сумма эффективных температур (ЭТ) выше 5 °С к концу месяца достигла 74,0 °С. Однако май был самый теплый за всю историю метеонаблюдений. Среднемесячная температура на 4,7 °С превысила региональную норму; 15–19 мая достигнуты новые температурные максимумы. Среднедекадная температура нарастала стремительно. К концу второй декады мая средне-

декадная температура составила 22,7 °С, сумма эффективных температур – 436,4 °С.

Набухание генеративных почек ели колючей в 2013 г. началось 22 апреля при сумме ЭТ 82 °С. При сумме ЭТ 137,2 °С (29 апреля) произошло разрушение покрова колпачка и выход мужских стробилов из почек. Пыление микростробилов ели колючей в условиях городской среды началось 8 мая, в условиях дендрария – 12 мая, когда сумма ЭТ достигла 215,3 °С и 260,4 °С соответственно. Пыление продолжалось в течение 3 сут в сухую безветренную погоду.

В 2014 г. температурный режим апреля превысил региональную норму. Среднедекадная температура воздуха выше 10 °С зафиксирована также во второй декаде, сумма ЭТ выше 5 °С к концу месяца достигла 166,9 °С. Май также был теплее нормы на 3,7 °С, сумма ЭТ составила 323,1 °С. Пыление ели колючей началось 10 мая при достижении суммы ЭТ 235,1 °С и продолжалось в течение 4 сут в сухую теплую погоду.

Определение жизнеспособности пыльцы *in vitro* и характера роста пыльцевых трубок в зависимости от условий произрастания и уровня антропогенного загрязнения. При оценке статуса адаптации генотипа к условиям среды качество пыльцевых зерен является одним из важнейших показателей репродуктивной биологии, во многом определяющим способность амфимиктично размножающихся растений к формированию полноценных семян. Микро- и гаметогенез оценивают функционально-адаптивные процессы, в числе прочих обеспечивающие надежность воспроизводства популяций растений [5].

Проведённое в 2013 г. исследование состояния мужского гаметофита в стандартных условиях проращивания (27 °С) показало, что жизнеспособность пыльцы деревьев желтопыльниковой формы ели колючей, произрастающих в экологически чистых условиях (дендрарий), практически вдвое выше, чем у деревьев, растущих в условиях техногенного загрязнения; однако значения длины пыльцевых трубок не имели значимых различий.

В 2014 г. для исследования были взяты те же деревья, а также дерево из дендрария с красной

окраской микростробилов (рис. 1 а и б). Разница в жизнеспособности пыльцы ели колючей из разных мест произрастания по результатам проращивания при стандартной температуре +27 °С была еще выше: от единичных проросших зёрен в условиях техногенного загрязнения до 73,0 % в экологически чистых условиях дендрария, при средней длине пыльцевой трубки – от 214 до 603 мкм.



Рис. 1. Ель колючая:
а) микростробил краснопыльничковой формы; б) микростробил желтопыльничковой формы;
в) непоросшие и аномальные пыльцевые зёрна: 1 – непоросшие; 2 – оптически пустые;
3 – с редуцированным телом; 4 – с вздутием пыльцевой трубки; 5 – двусторонне проросшие;
6 – с ветвлением пыльцевой трубки

Жизнеспособность пыльцы дерева ели колючей с красными стробилами, растущего в дендрарии, составила $27,1 \pm 4,4$ % (коэффициент вариации 15,88 %) при длине пыльцевых трубок 319 ± 79 мкм (коэффициент вариации 24,83 %), а желтопыльничковой формы – $73,0 \pm 5,88$ % (коэффициент вариации 7,93 %) при средней длине пыльцевых трубок 603 ± 128 мкм (коэффициент вариации 21,16 %).

Пыльца ели колючей, произрастающей в условиях техногенного загрязнения, имела очень низкую жизнеспособность – проросли только отдельные пыльцевые зёрна, при средней длине пыльцевой трубки 214 ± 60 мкм (коэффициент вариации 28,27 %).

Как в экологически чистых, так и в загрязнённых условиях встречались зёрна с различными аномалиями формирования пыльцевой трубки, а также собственно тела зерна. Среди пыльцевых зерен попадались единичные оптически пустые и зерна с редуцированным телом, а также

двусторонне проросшие, образующие вздутия и ветвления пыльцевой трубки. При этом среди пыльцы деревьев, произраставших в условиях техногенной нагрузки, наблюдается большее количество зерен, оптически пустых и имеющих редуцированное тело (рис. 1с).

Снижение жизнеспособности пыльцы в 2014 г. по сравнению с предыдущим годом, воз-

можно, вызвано такими неблагоприятными метеорологическими условиями, как повышенная температура воздуха и недостаточное количество осадков.

Изменение уровня жизнеспособности пыльцы и длины пыльцевых трубок ели колючей в зависимости от изменения температуры проращивания и условий формирования пыльцы. С целью выявления адаптационных возможностей изучаемых видов определены уровни жизнеспособности пыльцы и длины пыльцевых трубок при различных температурных режимах. Для данного исследования, помимо оптимальной (27 °С), были выбраны температуры проращивания 18 и 35 °С, так как в лаборатории в условиях термостата невозможно получить стабильную температуру ниже 18 °С, а повышение температуры до 35 °С приводит к полной потере жизнеспособности вследствие гибели пыльцы растений, находившихся в условиях антропогенного загрязнения (рис. 2 и 3).

При культивировании пыльцы в условиях пониженного температурного режима (18 °С) у нормальных деревьев ели колючей, произрастающих в условиях Экспериментально-показательного дендрария, достоверных различий жизнеспособности и скорости роста пыльцевых трубок не наблюдается. Расхождения укладываются в пределы стандартного отклонения. Деревья, произрастающие в условиях антропогенного загрязнения, имеют низкие показатели жизнеспособности и длины пыльцевых трубок, но их изменения находятся в пределах стандартного отклонения.

Повышение температуры культивирования оказало большое влияние на характеристики проращиваемой пыльцы. Жизнеспособность пыльцы желтопыльниковой формы ели колючей при повышенной температуре культивирования составляла $38,4 \pm 6,7$ % (коэффициент ва-

риации 17,2 %) при длине пыльцевых трубок 198 ± 81 мкм (коэффициент вариации 40,7 %). У деревьев ели колючей, произрастающих в условиях техногенного загрязнения, а также краснопыльниковой формы ели колючей произошла полная потеря жизнеспособности и гибель пыльцы.

Таким образом, стрессовые условия произрастания, недостаток влаги и, особенно, техногенное загрязнение, вызывают уменьшение возможностей адаптации пыльцевых зёрен к изменению температурного режима. При этом снижение температуры культивирования приводит к изменению жизнеспособности и скорости роста пыльцевых трубок, а повышение зачастую оканчивается гибелью пыльцы.

В то же время такие благоприятные условия формирования микроспор, как отсутствие загрязнителей и некоторая защита от недостатка



Рис. 2. Проращивание пыльцы ели колючей из благоприятных условий произрастания при разных температурах культивирования: а) +18 °С; б) +27 °С; в) +35 °С

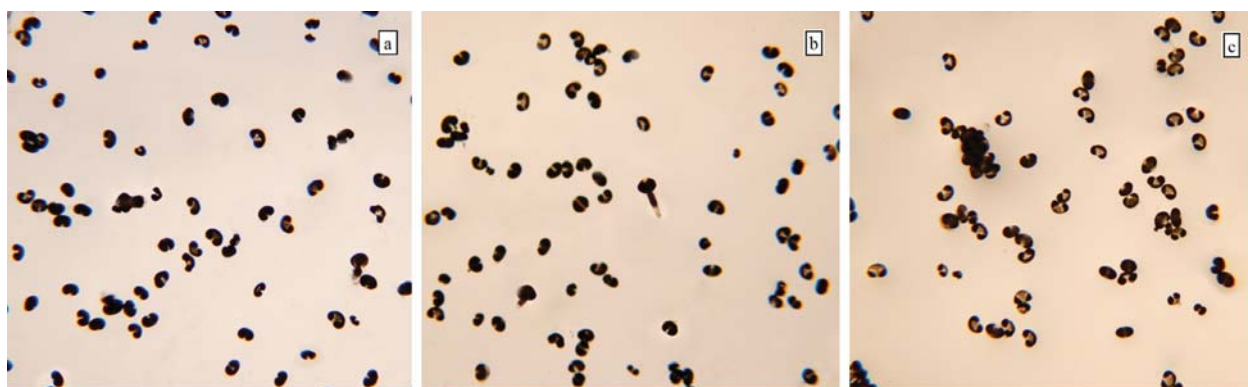


Рис. 3. Проращивание пыльцы ели колючей из неблагоприятных условий произрастания при разных температурах культивирования: а) +18 °С; б) +27 °С; в) +35 °С

Зависимость уровня жизнеспособности пыльцы и интенсивности роста пыльцевых трубок деревьев, произрастающих в разных условиях, от температуры проращивания

| Год | Условия произрастания, форма ели колючей | Жизнеспособность, %, при температуре, °С | | | Длина пыльцевых трубок, мкм, при температуре, °С | | |
|------|--|--|----------|----------|--|---------|--------|
| | | 18 | 27 | 35 | 18 | 27 | 35 |
| 2013 | Дендрарий, жёлтопыльниковая | 82,5±5,4 | 86,0±5,2 | 70,4±4,0 | 395±81 | 200±77 | 85±19 |
| | Городские условия, жёлтопыльниковая | 30,3±5,7 | 40,2±9,9 | 0 | 294±77 | 296±69 | 0 |
| 2014 | Дендрарий, жёлтопыльниковая | 73,4±2,9 | 73,0±5,9 | 38,4±6,7 | 466±123 | 603±128 | 198±81 |
| | Дендрарий, краснопыльниковая | 18,2±3,3 | 27,1±4,4 | 0 | 198±35 | 319±79 | 0 |
| | Городские условия, жёлтопыльниковая | 3,0±0,3 | 4,1±1,9 | 0 | 129±30 | 214±60 | 0 |

влаги и других неблагоприятных факторов среды (условия питомника), приводят к повышению адаптационных возможностей. В результате этого характеристики мужского гаметофита (жизнеспособность пыльцы, длина пыльцевой трубки) при пониженном тепловом режиме проращивания практически не отличаются от таковых при стандартных условиях, а при повышенном – изменяются, но гибели пыльцы при этом не происходит.

Выводы

В условиях городской среды у ели колючей отмечается смещение начала генеративного развития на более ранние сроки.

Определена жизнеспособность пыльцы ели колючей при стандартных условиях проращивания. В 2013 г. она составляла 40,2 % у дерева из городских условий и 86 % у дерева из дендрария, в 2014 г. варьировала от единичных проросших зёрен в условиях технопогенной нагрузки до 73 % у дерева из дендрария. Средняя длина пыльцевых трубок при стандартных условиях проращивания в 2013 г. составляла 200 мкм у дерева из дендрария и 296 мкм у дерева из городских условий, а в 2014 г. – 213,6 мкм у дерева из городских условий и 318,8 и 602,5 мкм у ели желтопыльниковой и краснопыльниковой форм из питомника.

Снижение температуры культивирования пыльцы практически не оказало влияния на ее

жизнеспособность и среднюю длину пыльцевых трубок, различия укладывались в пределы стандартного отклонения. Повышение же температуры проращивания вызвало значимое снижение жизнеспособности пыльцы и средней длины пыльцевых трубок у деревьев из питомника и привело к полной потере жизнеспособности и гибели пыльцы деревьев из городских условий.

Показано, что основными аномалиями в развитии являются: оптически пустые пыльцевые зерна и зерна с редуцированным телом; двустороннее прорастание зерна, приводящее к формированию двух пыльцевых трубок; образование вздутий на конце пыльцевой трубки; ветвления пыльцевой трубки; прорастание трубки через пыльцевой мешок; а также их различные комбинации.

Снижение жизнеспособности пыльцы в 2014 г. по сравнению с предыдущим годом, возможно, обусловлено такими менее благоприятными метеорологическими условиями, как повышенная температура воздуха и недостаточное количество осадков в период микроспорогенеза.

Таким образом, анализ жизнеспособности пыльцы и длины пыльцевых трубок подтверждает в целом хорошую приспособленность ели колючей к климатическим условиям Воронежа и, соответственно, её перспективность для лесостепной зоны. Однако выявлено отрицательное воздействие стрессовых условий, особенно техногенного загрязнения, на генеративную сферу данного вида хвойных интродуцентов, которое может значительно ухудшать её адаптивные возможности.

Список использованной литературы

1. Белобородов, В. М. Плодоношение сосны веймутовой в клоновом архиве / В. М. Белобородов, И. И. Иванова // Генетико-селекционные основы улучшения лесов : сб. науч. тр. – Воронеж, 1999. – С. 223.
2. Иванова, И. И. Некоторые особенности плодоношения лиственниц в Воронежской области / И. И. Иванова, М. В. Сафонова // Генетика и селекция на службе леса : сб. науч.тр. – Воронеж, 1997. – С. 261.
3. Сучкова, Г. А. Плодоношение некоторых хвойных пород в условиях городской среды / Г. А. Сучкова // Интеграция науки и высш. лесотехн. образования по упр. качеством леса и лесн. продукции : матер. междунар. научн.-практ.конф., 25–27 сент. 2001 г. – Воронеж : ВГЛА, 2001. – С. 317-319.
4. Стародубцева, Л. М. Фенология генеративного развития хвойных экзотов в дендрариях НИИЛГиС / Л. М. Стародубцева // Достижения и проблемы лесной генетики и селекции (к 40-летию НИИЛГиС) : сб. науч. тр. – Воронеж, 2010. – С. 212.
5. Булыгин, Н. Е. Дендрология. Фенологические наблюдения над хвойными породами : учеб. пособ. для студ. лесхоз. факультета / Н. Е. Булыгин. – Л., 1974.
6. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М. : Колос, 1980. – 304 с.
7. Свинцова, В. С. Влияние засухи на генеративную сферу и жизнеспособность пыльцы сосны обыкновенной / В. С. Свинцова, Н. Ф. Кузнецова, Е. Ю. Пардаева // Лесоведение. – 2014. – № 3. – С. 50–58.

Referens

1. Beloborodov, V. M. Plodonoshenie sosny vejmutovoj v klonovom arxive / V. M. Beloborodov, I. I. Ivanova // Genetiko-selekcijonnye osnovy uluchsheniya lesov : sb. nauch. tr. – Voronezh, 1999. – S. 223.
2. Ivanova, I. I. Nekotorye osobennosti plodonosheniya listvennicz v Voronezhskoj oblasti / I. I. Ivanova, M. V. Safonova // Genetika i selekciya na sluzhbe lesa : sb. nauch.tr. – Voronezh, 1997. – S. 261.
3. Suchkova, G. A. Plodonoshenie nekotoryx xvojnyx porod v usloviyax gorodskoj sredy / G. A. Suchkova // Integracziya nauki i vyssh. lesotexn. obrazovaniya po upr. kachestvom lesa i lesn. produkcii : mater. mezhdunar. nauchn.-prakt.konf., 25-27 sent. 2001 g. – Voronezh : VGLA, 2001. – S. 317-319.
4. Starodubczeva, L. M. Fenologiya generativnogo razvitiya xvojnyx ekzotov v dendrariyax NIILGiS / L. M. Starodubczeva // Dostizheniya i problemy lesnoj genetiki i selekcii (k 40-letiyu NIILGiS) : sb. nauch. tr. – Voronezh, 2010. – S. 212.
5. Bulygin, N. E. Dendrologiya. Fenologicheskie nablyudeniya nad xvojnyimi porodami : ucheb. posob. dlya stud. lesoxoz. fakul'teta / N. E. Bulygin. – L., 1974.
6. Pausheva, Z. P. Praktikum po czitologii rastenij / Z. P. Pausheva. – M. : Kolos, 1980. – 304 s.
7. Svinczova, V. S. Vliyanie zasuxi na generativnuyu sferu i zhiznesposobnost' pyl'czy sosny obyknovennoj / V. S. Svinczova, N. F. Kuzneczova, E. Yu. Pardaeva // Lesovedenie. – 2014. – № 3. – S. 50–58.

Male generative sphere study as a way to identify promising introduced species

M. Yu. Chugreev – Russian Research institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Researcher – Voronezh State University, michael.yurievich@yandex.ru

L. M. Starodubtceva – Russian Research institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Researcher

*The results of blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) pollen viability research, its dependence from the growing conditions, the level of technogenic pollution, and changes in the temperature of germination are presented in this study. Pollen germinated at various temperatures in a thermostat in petri dishes on a nutrient medium, containing agar, sucrose and boric acid. Pollen with various pollen tube and body grain anomalies observed both in ecologically clean and in polluted conditions.*

Among the pollen grains found optically empty grain, grain with reduced body, blistering and branching of the pollen tube. Moreover, a large number of optically empty and grains with a reduced body observed among the pollen of trees, growing in the conditions of anthropogenic impact. Less favorable weather conditions cause a decreasing of viability of pollen in comparison to the previous year.

Cultivation of pollen at 18 °C make no significant differences of viability and rate of growth of pollen tubes between different trees, growing in arboretum. Discrepancies fit within the standard deviation. Trees, growing in anthropogenic polluted conditions, have low levels of vitality and the length of the pollen tubes, but the differences were not significant, and lay within the standard deviation.

Raising of cultivation temperature had a greater impact on characteristics of germinated pollen. The increased temperature greatly affected the blue spruce trees, growing in the conditions of technogenic pollution and red-pollen form, causing a complete loss of viability and death of pollen.

It can be concluded that stressful growing conditions, such as lack of water and technogenic pollution, cause a reduction of adaptable ability to changes in germinating temperature. Decrease of cultivation temperature leads to a change of viability and the rate of growth of pollen tubes, and often ends with the death of pollen. Favorable conditions for the formation of microspores such as the absence of pollutants and protection against lack of water and other adverse factors lead to increased adaptable ability.

Keywords: *blue spruce, introduced coniferous, generative sphere, pollen, technogenic pollution, drought.*