

## РЕАКЦИЯ НА СТРЕСС И ЕЕ ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ И ПРИ СМЕНЕ ПОКОЛЕНИЙ

Н.Ф. Кузнецова<sup>1</sup>, О.С. Машкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции  
394087 Воронеж, Ломоносова, 105, e-mail: [ilgis@lesgen.vrn.ru](mailto:ilgis@lesgen.vrn.ru)

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет  
394006 Воронеж

Обобщены результаты многолетнего опыта по химическому мутагенезу у сосны обыкновенной. Показано, что реакция сосны на действие химических мутагенов (НММ и НДММ, 0,05 %) имеет длительный период последействия. Она охватывает два поколения и связана с повышенной изменчивостью признаков, уродствами, низкой жизнеспособностью и конкурентоспособностью растений, плохим качеством семян и др. У потомств 16 материнских деревьев на популяционно-онтогенетическом (постэмбриональном), предэмбриональном и эмбриональном этапах жизненного цикла прослежен путь стабилизации генома при переходе его из состояния стресса в состояние нормы. У разных модельных объектов изучен эффект взаимодействия нескольких стрессовых ситуаций (засуха + последствие химических мутагенов; засуха + техногенный стресс). Установлено, что одной из причин пустоосеменности может быть стресс, перенесенный растением на фенокритической стадии онтогенеза.

**Ключевые слова:** сосна обыкновенная, химические мутагены, техногенный стресс, изменчивость, признаки вегетативной и семенной продуктивности

Results of continuing experience on chemical mutagenesis at a *Pinus sylvestris* were generalized. It is shown, that reaction of a pine to action chemical mutagens (NMM and NDMM, 0,05 %) has the prolonged period aftereffect. It covers two generations and is connected to the raised variability of signs, deformity, low viability and competition of plants, bad category of seeds, etc. On population-ontogenetic (postembryonic), proembryonic and embryonic stages of vital cycle at generations of 16 parent trees the way of genome stability from a stress condition in a norm condition were tracked. At different model objects the effect of interaction of several stress situations (a drought + chemical mutagens; a drought + ethnogeny stress) are studied. It is established, that the stress experienced by a plant on a phenocritical stage of ontogenesis can be one of the reasons of empty seeds origin.

**Key words:** *pinus sylvestris* L., chemical mutagens, ethnogeny stress, variation, vegetative and seed efficiency signs

### ВВЕДЕНИЕ

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) - быстрорастущая, светолюбивая, ветроустойчивая и засухоустойчивая порода. Благодаря способности приспосабливаться к крайне неблагоприятным условиям экологического ее относят к видам стресс-толерантам (Миркин, 2000). Техногенный стресс выявил еще одно ее качество – повышенную чувствительность к загрязнению среды (Лесные экосистемы ..., 1990).

В зонах экологического неблагополучия сосна первая проявляет признаки деградации и погибает. Ее устойчивость в 6 раз ниже, чем березы. Поэтому данный вид рекомендован для использования в системе биомониторинга (Буторина и др., 2001; Гераскин и др., 2005; Калашник, 2008). У лесных древесных растений выработка адаптаций к новому типу стресса осложнена тем, что внутри ареала число и расположение мест техногенного загрязнения, набор и концентрация токсических веществ постоянно меняются. Как следствие, популяционный генофонд закладывается в одних условиях среды, а реализуется в серии других, к которым он не адаптирован. К тому же на загрязненных территориях многие вещества ведут себя как мутагены. Все это не могло не отразиться на состоянии сосновых лесов: генетическом разнообразии, показателях генеративной и вегетативной сферы деревьев, качестве семенного потомства.

Одним из подходов изучения данной проблемы является представление, что лесные древесные растения в местах промышленного и радиационного загрязнения используют те же приспособительные реакции, которые были выработаны в ответ на естественные биотические и абиотические факторы стресса (заморозки, вредители и др.) (Кулагин, 1985; Федоров, 1999). Получены данные, что самофертильные формы сосны обыкновенной более устойчивы к действию химических мутагенов, чем самостерильные (Машкина и др., 2009). Считается, что информативность данных о состоянии природных систем существенно повысится, если исследования будут проводиться как в зонах экологического бедствия, так и на специально созданных экспериментальных объектах (Ирошников, 2002).

Основные положения теории стресса вначале были разработаны для животных (Селье, 1960). Современная концепция теории стресса охватывает все уровни иерархической организации животных, растений и микроорганизмов – от ДНК, хромосом, клеток до организмов и популяций в целом (McClintock, 1984; Hendrichs, 1992; Пахомова, 1995; Судачкова, 1998; Бурлакова, 2004; Даев, 2007; и др.). Предполагается, что существуют специальные внутриклеточные механизмы по перестройке генома, включающиеся в ответ на действие стрессоров, и нормализующиеся, когда их действие прекращается (McClintock, 1984). Стресс вызывает дестабилизацию генома и однотип-

ную стресс-реакцию на одинаковые условия раздражителя. При дестабилизации генома индуцируется рост изменчивости признаков (цитогенетических, анатомических, морфологических и др.) (Levitt, 1980; Wurgler, Kramers, 1992; Шумный, Маркель, 2000; Гераськин и др., 2005; и др.). Как правило, данный процесс сопряжен с карликовостью, уродствами, низкой жизнеспособностью и неконкурентоспособностью особей. Последующее удаление большинства вариаций тесно связано с действием систем репарации в направлении адаптации выживших генотипов к новым условиям (Шумный, Маркель, 2000).

В настоящем сообщении обобщены результаты опыта по химическому мутагенезу, проводимому на сосне обыкновенной с 1991 года и по настоящее время. Целью исследований является изучение отдаленных последствий действия химических мутагенов; процесса возвращения нарушенного генофонда из состояния стресса в состояние нормы по ходу онтогенеза и при смене поколений; взаимодействия нескольких стрессовых ситуаций (засуха + последствие химических мутагенов; засуха + техногенное загрязнение); использование экспериментальных данных в системе экологического мониторинга сосны.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовались объекты сосны обыкновенной трех категорий: испытательные культуры и насаждения сосны, произрастающие в зонах техногенеза и на экологически безопасной территории. Эксперимент по химическому мутагенезу проводили в два этапа: I этап – с 1990 года и по настоящее время; II этап – с 2002 по 2005 год.

I этап. Схема опыта по химическому мутагенезу следующая. В 1990 году собраны семена от свободного опыления с деревьев №№ 63, 64, 68, 72, 75, 81, 82, 86, а также с 16, С-12, 245-3, 266-4, Г-33, 96/51, 217-2, 346-1, предоставленные д.б.н. Ю.Н. Исаковым. Модельный объект ( $M_0$ ) расположен вблизи Воронежского биосферного заповедника (Воронежский лесхоз, пос. Ступино). Семена перед посевом подеревно обработаны химическими супермутагенами: нитрозометилмочевинной (НДММ) и нитрозометилмочевинной (НММ) в концентрации 0.05% при экспозиции 24 часа. Контролем служили семена от тех же деревьев, замоченные в воде на 24 часа. В 1993 году из выращенных в теплице 2-летних растений ( $M_1$ ) заложены испытательные культуры (Воронежский мехлесхоз, пос. Князево, экологически безопасная территория).

II этап. В 2002 году семена от свободного опыления ( $M_2$ ) собраны с 6 деревьев ( $M_0$  - №№ 16, С-12, 245-3, 266-4, Г-33, 346-1) и у их потомств из опытных и контрольных вариантов ( $M_1$  - №№ 4, 5, 12, 13, 14, 15) и высеяны в теплицу. Анализ  $M_1$  потомств в первом опыте и  $M_1$  и  $M_2$  во втором проводился по следующим показателям: признаки семенной продуктивности дерева - число и процент полных и пустых семян в шишке (капсулы меньше минимального размера семени не учитывались), грунтовая всхожесть семян на 21-й день после посева; выживаемость и высота растений по годам вегетации; время вступления

потомств ( $M_1$ ) в репродуктивную фазу; количество морфологически измененных растений в семьях. К карликовым растениям относили те, высота которых не превышает величины 0,5 от среднего значения контроля одного класса возраста. Так, в 10-летнем возрасте к карликовым относили растения, имеющие высоту менее 100 см, к низкорослым – 100-150 см, к типичным по росту – 150-250 см, к быстрорастущим – более 250 см. Среднее значение высоты растений в контроле составило  $208 \pm 4,7$  см. Цитологические исследования (анализ частоты и спектра патологий митоза) проводили на давленных препаратах по общепринятой методике (Топильская и др., 1977). Данные обрабатывались с использованием статистического пакета программ Stadia. Экологический мониторинг проводится на двух тест-объектах – «Московское шоссе» и Ступинский модельный объект. Опытный объект «Московское шоссе» (27 деревьев) расположен вдоль оживленной автомагистрали «Воронеж-Дон» и в черте города. Данное насаждение испытывает хроническое воздействие выхлопных газов, частые низовые пожары и значительную рекреационную нагрузку. По ведущим загрязняющим веществам превышение ПДК здесь составляет 1,8-10 раз (Доклад о состоянии окружающей среды ..., 2006). Ступинский тест-объект (Воронежский лесхоз, Рамонское лесничество, экологически безопасная территория, 30 деревьев) является контролем. Это постоянный модельный объект, на котором с 1988 года проводится мониторинг размножения сосны в норме.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В эксперименте смоделирована стрессовая ситуация. НДММ и НММ, как сильные раздражители и мутагены, возмутили семенной генофонд (сформированный в экологически благоприятных условиях) в момент прорастания семян. Реакцией на стресс стала массовая гибель зародышей и рост изменчивости признаков у выживших семян (Кузнецова и др., 1993). Из таблицы 1 видно, что химические мутагены имеют длительный период последствия. Они затронули как вегетативную, так и генеративную сферу растений. Сохранность индуцированных семян и их приживаемость при создании культур почти вдвое ниже, чем в контроле. Отмечен медленный рост растений в высоту. Число низкорослых растений и карликов у 2-летних семян составляло большинство – 58,6 % (рис. 1). Среди них было много морфологически измененных растений - альбиносов, хлорофильных мутантов, треххвойных, короткохвойных, с разной длиной хвои и др. Но даже те деревья, которые имели типичный для сосны данного возраста фенотип, характеризовались более поздним половым созреванием, плохим качеством семян. Различия между семьями сохраняются до настоящего времени, несмотря на то, что пониженная жизнеспособность и естественный отбор способствуют снижению их изменчивости. Более 80 % морфологически измененных растений погибло во время первичного, относительно свободного роста культур. На рисунке 1 показано как изменилось распределение растений по высоте в индуцированных

семьях к 10-летнему возрасту. В последние годы произошло смыкание крон в культурах, и отбор между деревьями начал идти более интенсивно. Первый урожай шишек в культурах зафиксирован в 2000 году на единичных деревьях. С 2002 года по мере вступления деревьев в репродуктивную фазу проводится учет урожая шишек и семян по вариантам опыта. Выявлена реакция на стресс генеративной сферы, несмотря на то, что все изученные деревья по морфологическим

признакам относились к категории “нормальные”. Показатели семенной продуктивности снижены в 1,5-2 раза. Из 52 проанализированных к 2007 году деревьев ингибирующего (опытного) варианта было 9 стерильных, 14 с сильно (в 2,5-5 и более раз), 11 с частично (в 1,5-2 раза) редуцированной продуктивностью, 18 нормальных и близких к норме форм. Несколько меньше различия между вариантами по всхожести семян (на 30 %).

**Таблица 1 - Показатели семенной и вегетативной продуктивности у индуцированного химическими мутагенами и контрольного потомства сосны обыкновенной в онтогенезе (M<sub>1</sub>) и при смене поколений (M<sub>2</sub>) в 1991-2007 гг.**

Анализируемые показатели	Контроль	НДММ (или НММ) 0,05%
M <sub>1</sub> (1991-2007 гг.)	62,0 ± 2,4	38,1 ± 2,7 ***
1. Грунтовая всхожесть семян, %	1600	1600
2. Количество измененных 1-летних сеянцев, %	0,9 ± 0,3 935	10,4 ± 2,8 *** 604
3. Выживаемость 2-летних сеянцев, %	76,6 ± 1,9 731	58,7 ± 2,2 *** 362
4. Приживаемость растений в культурах, %	72,0 ± 2,5 528	52,7 ± 4,7 ** 193
5. Высота 2-летних растений, см	12,5 ± 0,5 731	7,6 ± 0,3 ** 362
6. Высота 10-летних растений, см	208 ± 4,7 519	169,4 ± 6,9 *** 181
7. Количество плодоносящих деревьев в 2002г., %	28,2 ± 3,8 517	15,7 ± 3,9 * 176
8. Количество плодоносящих деревьев в 2005г., %	66,9 ± 5,2 509	53,8 ± 3,2 164
M <sub>2</sub> (2006 г.)	24,8 ± 1,7	10,6 ± 2,2 ***
9. Число семян на шишку, шт.	12	12
10. Полнозернистость семян, %	78,9 ± 1,9 12	23,4 ± 6,3 *** 12
11. Лабораторная всхожесть семян, %	80,1 ± 2,6 1200	61,1 ± 2,9 *** 1200
M <sub>2</sub> (2007 г.)	17,8 ± 1,8	11,3 ± 1,0 *
12. Число семян на шишку, шт.	12	14
13. Полнозернистость семян, %	32,3 ± 2,1 12	19,9 ± 2,3 * 14
14. Лабораторная всхожесть семян, %	60,5 ± 2,6 1200	57,1 ± 5,7 1400

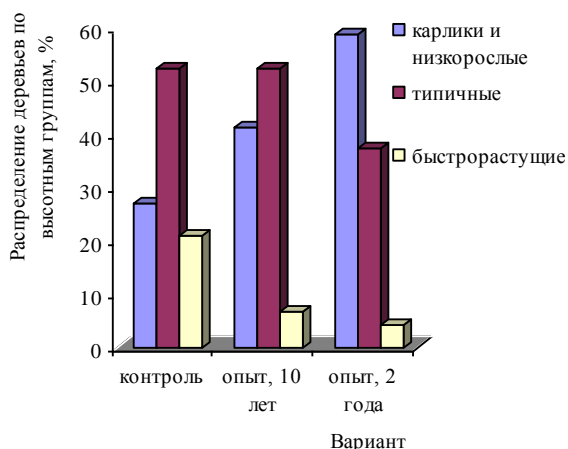
Примечание: 1) в знаменателе объем выборки; 2) разница между контрольными и опытными вариантами достоверна при: \*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01, \*\*\*P ≤ 0.001.

В 2002 году мужское цветение в культурах отсутствовало. Это полностью исключило инбридинговую депрессию из причин возникновения пустых семян в шишках. Другие факторы, ведущие к пустосемянности (плохие погодные условия, недоопыление, низкое качество пыльцы) также исключались. Условия для перекрестного опыления в этот год были хорошими. Опыление происходило от стены близлежащего леса. Завязываемость семян у материнских деревьев и у их необработанных потомств в культурах высокая. Поэтому стерильность и низкую семенную продуктивность деревьев в индуцированных семьях можно объяснить только нарушениями, возникающими в генетическом материале под влиянием химических мутагенов. Затем семена от свободного опыления от опытных (M<sub>1</sub>) и

двух смежных поколений контроля (M<sub>0</sub> и M<sub>1</sub>) были высеяны в теплицу, где в течение трех лет изучался рост и состояние сеянцев (табл. 2). Сравнение семей по вариантам опыта по таким показателям как выживаемость, рост и число измененных сеянцев не выявило между ними различий. Таким образом, к началу нового цикла онтогенеза аутбредное потомство от индуцированных и контрольных деревьев по морфологическим признакам вышло на одинаковый уровень изменчивости.

Цитогенетическое изучение индуцированных потомств двух смежных поколений (M<sub>1</sub> и M<sub>2</sub>) дало нам информацию о продолжительности последствия химических мутагенов (Машкина и др., 2008). Показано, что в год обработки семян (M<sub>1</sub>) 0,05% НММ частота

патологий митоза в проростках увеличивается в 8 раз по сравнению с контролем. В следующем поколении (M<sub>2</sub>), после того как генетический материал прошел через половой процесс, разница вариантами сокращается в 4 раза и составляет 2-кратное превышение.



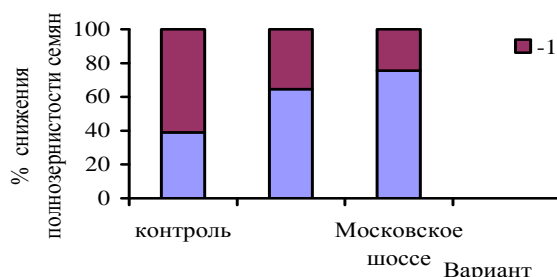
**Рисунок 1 - Распределение растений по высотным группам у индуцированных и контрольных потомств сосны обыкновенной в 2 и 10-летнем возрасте**

Следовательно, инициированный обработкой высокий мутационный темп и стресс-реакция, постепенно затухая, захватывают онтогенез, переходят в половые клетки, а затем в клетки дочернего поколения и становятся причиной нестабильности их генома. Новое поколение несет на себе следы стресса перенесенного материнскими деревьями в виде остаточной изменчивости. По-видимому, для полного возвращения возмущенного генома в равновесное состояние требуется гораздо больше времени, чем оборот одного поколения.

2007 г. был годом засухи. Засуха – наиболее часто встречающийся тип погодного стресса в ЦЧО. Ведущими факторами стресса при ней являются повышенный температурный режим и дефицит влажности. С начала плодоношения культур это первая и довольно сильная засуха. Она вызвала почти 3-кратное

снижение урожая семян, как у материнских деревьев, так и у их потомств в контроле (табл. 1). Напротив, урожайность деревьев, произрастающих на сильно загрязненной территории («Московское шоссе») в этот год практически не изменилось. По отношению к данным оптимальных лет его величина стала ниже всего на 25 %. Полнозернистость семян составила 58,1 %, что в 2 раза выше, чем у объектов контроля. Два других анализируемых показателя остались на уровне оптимальных лет. Аналогичная реакция генеративной сферы на засуху выявлена и у индуцированных деревьев ингибирующего варианта в культурах (табл. 1).

В 2007 году индуцированные семьи испытали кумулятивный эффект двух факторов - засухи и последствие химических мутагенов, а насаждение «Московское шоссе» - засухи и техногенного стресса. У них мы выделили реакцию на засуху из общей стресс-реакции (рис. 2). Для этого данные семенной продуктивности 2007 г. соотнесены к «своим» показателям оптимальных 2005-2006 лет, усредненные значения которых приняли за 100 %. Оказалось, что в меньшей степени влиянию засухи подвержены деревья, пережившие стресс при обработке семян мутагеном и деревья, претерпевающее хронический техногенный стресс в настоящее время.



**Рисунок 2 – Снижение полнозернистости семян у деревьев сосны обыкновенной в 2007 г. в разных вариантах опыта (1 – доля урожая семян редуцированная засухой)**

**Таблица 2 - Показатели семенной и вегетативной продуктивности, патологий митоза у индуцированного химическими мутагенами и контрольного потомства сосны обыкновенной (M<sub>1</sub>) и у исходных материнских деревьев (M<sub>0</sub>) в 2002-2005 гг.**

Анализируемые показатели	Исходные деревья (M <sub>0</sub> )	Контроль (M <sub>1</sub> )	Опытный вариант (M <sub>1</sub> )
1. Число семян на шишку, шт.	28,1 ± 1,4 6	28,2 ± 1,6 6	11,0 ± 1,4 *** 6
2. Полнозернистость семян, %	76,5 ± 4,2 6	82,8 ± 2,7 6	28,6 ± 6,4 *** 6
3. Грунтовая всхожесть семян, %	66,4 ± 4,0 600	62,7 ± 5,4 900	41,7 ± 4,8* 600
4. Количество измененных 2-летних сеянцев, %	0,7 ± 0,2 393	0,8 ± 0,2 558	0,9 ± 0,3 244
5. Выживаемость 2-летних сеянцев, %	71,9 ± 3,2 393	69,3 ± 3,5 558	71,7 ± 2,9 244
6. Высота 3-летних сеянцев, см	24,4 ± 0,4 364	24,2 ± 0,4 517	26,9 ± 0,3 227
7. Частота патологий митоза, %	-	1,0 ± 0,3	2,2 ± 0,4*

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение сосны в возрастной динамике показало, что эффективность действия мутагенов усиливается по мере приближения обработки к репродуктивному периоду (Романовский, 1997). Половое воспроизведение включает ряд критических стадий чувствительных к внешнему воздействию: мейоз, ранний эмбриогенез, в том числе и фенокритическая стадия, которая данный период завершает (Шварц, 1980; Andersson, 1980; Репродуктивные структуры ..., 1982; Кузнецова, 1988; и др.; Романовский, 1997.). Фенокритическая стадия - это время встречи новых индивидуумов с внешней средой, в которую они должны интегрироваться по принципу взаимодействия генотип-среда. Окружающая среда в это время выступает как система переключателей, определяя в пределах нормы реакции вида канал, по которому генотип зародыша начнет реализовываться в фенотип растения (Шварц, 1980). Мы полагаем, что выход семян из состояния покоя сопряжен со стрессом, поскольку после данной стадии даже в благоприятных условиях генофонд семян дает начало фенофону сеянцев, который характеризуется повышенной изменчивостью признаков: морфологических, цитологических, генетических и др. (Животовский, Духарев, 1985; Романовский, 1994). Таким образом, наш опыт начался с того, что семена, сформированные в оптимальных условиях, во время обработки были вынуждены взаимодействовать (по принципу генотип-среда) со средой, содержащей НДММ и НММ в сублетальных концентрациях. Действие мутагенов пришлось на фенокритическую стадию, когда фенотипическая изменчивость будущих растений расширяется естественным путем (Шмальгаузен, 1968; Шварц, 1980). Дополнительный стресс усилил этот механизм расширения. А мутационные процессы наложили отпечаток на генетический материал. В сбалансированной системе мутации и стресс могли затронуть любые признаки, вызывать разную степень их изменения, практически всегда ее ухудшая (Тимофеев-Рессовский и др., 1973; Dobbertin, 2005). Это привело к массовой гибели чувствительных к мутагену зародышей. А выжившие характеризовались разной степенью мутабельности и приспособленности к мутагену. Среди 1-летних сеянцев встречалось много мутантных, морфологически измененных карликовых и низкорослых растений пониженной жизнеспособности. Известно, что качество популяционного генофонда регулируется на всех этапах его развития – предэмбриональном, эмбриональном и популяционно-онтогенетическом (постэмбриональном). Каждый из них начинается с расширения изменчивости (генотипической, фенотипической), а по ходу и при смене этапов происходит ее сужение, благодаря чему генотипический состав приводится от этапа к этапу, от поколения к поколению в соответствие со средой обитания (Stockwell, 1939; Barnes et al., 1962; Hall, 2001; Кузнецова, 2003; и др.). Естественный отбор действует направленно и на генотип в целом (Шмальгаузен, 1968; Хедрик, 2003). На примере индуцированных семей проследим путь возвращения генетического материала из состояния стресса в состояние нормы по ходу онтогенеза и при смене поколений, приняв гено-

фонд 1-летних сеянцев ( $M_1$ , 604 растения) в качестве отправной точки для анализа. Первые два года сеянцы выращивались в теплице, т.е. в выровненных условиях. Но их генетическая конструкция в момент прорастания семян была адаптирована (по принципу взаимодействия генотип-среда) к другой среде, содержащей мутагены. Канал же, по которому генотип зародыша уже начал реализовываться в фенотип растения еще раз, по-видимому, измениться не может. Значительная часть морфологически измененных, карликовых и низкорослых растений погибла в раннем возрасте и при создании культур (рис. 1). Таким образом, в онтогенезе, начиная с первого года и по настоящее время, идет направленный процесс восстановления нарушенного мутагеном генофонда. Из-за низкой жизнеспособности и действия сил отбора избыточная изменчивость начала сужаться и вводиться в нормальное русло.

Следующим шагом в жизни культур является переход их к половому размножению. В индуцированных семьях число деревьев, которые, достигнув репродуктивного возраста, начали плодоносить, на 1/3 меньше, чем в контроле. Дифференциальное воспроизводство также способствует восстановлению «аномального» генофонда. Но эти изменения касаются генетического материала нового поколения.

Жизнь 1-го поколения необработанных потомков от индуцированных деревьев начинается с предэмбрионального этапа. На данном этапе по мужской и женской генеративной линии репродуктивного цикла образуется большое число генетически неидентичных пыльцевых зерен и яйцеклеток. Во время мейоза генотипическая изменчивость мужских и женских гамет существенно расширяется, как результат рекомбинации генов при кроссинговере. Сам же механизм мейоза очень чувствителен как к условиям внешней среды, так и к наследственным аномалиям материнских деревьев (Andersson, 1980; Репродуктивные структуры ..., 1982; и др.).

В последние десятилетия появились работы о нестабильности генома у потомков облученных родителей (Wiley et al., 1997; Marchetti F., Wyrobek, 2005). Доказано, что повышенный мутационный темп захватывает половые клетки и является причиной их эмбриональной смертности. В нашем опыте в индуцированных семьях полностью и частично стерильные формы составляли более половины всех проанализированных деревьев, что указывает на высокую степень нарушения их генома. Естественно, пул пыльцы и семяпочек этих деревьев содержит много нежизнеспособных гамет, обусловленных летальными мутациями, хромосомными перестройками, перераспределением генотипов и др. Развитие части из них прекращается еще до оплодотворения. Расширение генотипической изменчивости в процессе мейоза и последующие ее сужение при отборе, в ходе которого удаляются нежизнеспособные вариации, ведет к нормализации генофонда мужских и женских гамет, частично, а у некоторых деревьев полному его освобождению от нарушений и избыточной изменчивости, вызванной химическими мутагенами.

Более полную картину генеративных процессов в половых клетках индуцированных деревьев дают нам

данные формирования урожая семян в 2002 г. на участке испытательных культур. Во-первых, как уже говорилось, отличительной чертой семенной продукции этого года является то, что в 2001 г. мужское цветение в культурах еще отсутствовало. Пыльца, поступающая на плантацию извне, обеспечила при перекрестном опылении высокую урожайность деревьев и хорошее качество семян у всех семей контрольного варианта. Поэтому состояние мужской генеративной сферы в целом мы оцениваем как удовлетворительное. Это обстоятельство является важным. Оно позволяет выявляемые отклонения описывать как нарушения женской генеративной сферы, вызванные химическими мутагенами. Во-вторых, спецификой развития семяпочек сосны является то, что ее семенная капсула достигает размера зрелого семени к оплодотворению (Sargas, 1962). И тот факт, что семенная капсула не сформировалась, указывает на то, что их развитие остановилось до оплодотворения. Соответственно, число нормально развивающихся семяпочек прямо связано с количеством сохранившихся семян (полных и пустых) в шишках. Следовательно, с учетом особенностей плодоношения культур и специфики формирования семяпочек, степень нарушения генеративных процессов у деревьев в проэмбриогенезе можно оценить с помощью такого показателя, как число семян на шишку. В 2002 году выход семян из шишек в индуцированных семьях по сравнению с соответствующими семьями контроля был редуцирован более чем в 2 раза. Эти данные свидетельствуют о наличии и высокой интенсивности протекания стресс-реакций у сосны на проэмбриональном этапе. Эмбриональный этап начинается с оплодотворения, возникновения диплоидной зиготы и завершается образованием семян. Как и предыдущий этап, он включает механизмы, которые обеспечивают увеличение числа структур репродукции (архегонияльная и кливажная полиэмбриония), расширение генотипической изменчивости (как результат перекрестного опыления и возникновения множества комбинаций генов при оплодотворении) и отбор (эмбриональная селекция) (Кузнецова, 2003). Образование пустых семян у сосны приятно описывать как пустосемянность. Причины пустосемянности могут быть разные – эмбриональные летали, инбридинговая депрессия, погодный стресс и др. В семенной продукции 2002 г. данные причины сведены к минимуму. Эмбриогенез протекал в типичных для региона условиях. У исходных материнских деревьев ( $M_0$ ) и у их необработанных потомств в испытательных культурах ( $M_1$ , контроль) урожайность семян была на уровне 75-96 %. Соответственно, из-за отсутствия мужского цветения исключались самооплодотворение и инбридинговая депрессия. Это дало нам возможность оценить интенсивность стресс-реакции у индуцированных деревьев в эмбриогенезе, исходя из состояния у них такого показателя как полнотернистость семян. Для семей ингибирующего варианта он составил 29% при размахе варьирования признака 0-76,6 %. Столь высокий уровень пустосемянности подтверждает сохранение реакции на стресс в эмбриогенезе, что, по-видимому, обусловлено следующими причинами. В оплодотворении 2002 г. участвовали преимущественно нормальные мужские га-

меты и женские гаметы, варьирующие по степени нарушения. При слиянии они дали начало разным по жизнеспособности зародышам. Нежизнеспособные комбинации вызывают аномалии в развитии и высокую эмбриональную смертность, что влечет за собой увеличение доли пустых семян в шишках индуцированных деревьев. Поэтому пустосемянность не всегда отрицательное явление. В нашем опыте – это шаг по «освобождению» генофонда от последствий дисбаланса и нарушений, вызванных химическими мутагенами. На эмбриональном этапе данный процесс ведет к удалению нежизнеспособных и неадаптированных зародышей, что увеличивает долю нормообразующих генотипов среди выживших семян.

Эмбриональный этап сменяется популяционно-онтогенетическим. Формирование семян в 2002 г. происходило в типичных для региона погодных условиях. Их генофонд является полностью гибридным по происхождению. Сеянцы выращивались в условиях теплицы. Тем ни менее результаты показали, что реакция на стресс захватывает дочернее поколение ( $M_2$ ), которое не подвергалось обработке. Лабораторная всхожесть семян в семьях опытных вариантов ниже на 1/3, чем в контроле. Однако после прорастания семян и сопутствующего ему отбора ее интенсивность существенно снижается. Если судить по состоянию 3-летних сеянцев, то их изменчивость по морфологическим признакам вышла на уровень контроля (табл. 2). Остаточная изменчивость, выявляемая по цитологическим показателям, составляет двукратное превышение. Разное поведение опытных и контрольных объектов в условиях засухи дало нам дополнительную информацию о таких явлениях как реакция на стресс, изменчивость, устойчивость к повторному стрессу, взаимодействие нескольких стресс-ситуаций и др. Оказалось, что от засухи сильнее пострадали объекты контроля, генетический материал которых находится в наиболее сбалансированном состоянии. Напротив, опытные деревья, которые перенесли стресс в экспериментальных условиях, и деревья, произрастающие в условиях техногенного стресса, были к ней менее чувствительны. Отличительной чертой последних в оптимальные годы является низкое качество семян и высокая изменчивость признаков (остаточная в первом случае и постоянно индуцируемая во втором) в пределах нормы реакции вида. Как свидетельствуют результаты, сила первоначального отклика растений на погодный стресс прямо зависит от исходного состояния (степени стабильности) их генома. Данные кумулятивного взаимодействия разных стрессоров для древесных являются новыми. Как нам представляется, их необходимо учитывать при проведении экологического мониторинга. Ведь для сосны характеризующейся длительным онтогенезом одновременное проживание нескольких стресс-ситуаций – обычное явление.

Таким образом, НММ и НДММ, как сильные раздражители и мутагены, дестабилизировали геном будущих растений в момент прорастания семян (феноритическая стадия) и вызвали у них мощную ответную стресс-реакцию. У сосны она имеет длительный период последствия, захватывает как минимум два смежных поколения – материнское и дочернее. На

протяжении всей жизни их генетический материал несет на себе ее следы. Если действие стрессора прекращается, то в следующем (дочернем) поколении интенсивность реакции существенно снижается. Нестабильность генома проявляется на разных уровнях организации растений и связана с расширением диапазона изменчивости признаков (Wurgler, Kramers, 1992; Bickhman et. al., 2000; Муратова и др. 2009). Повышенная изменчивость - это особое состояние организма. Она влияет на все жизненно важные процессы и функции растений: рост, выживаемость и др., в том числе и на интенсивность отклика на стресс. Здесь важно подчеркнуть, что сила первоначального отклика растения на стресс и уровень изменчивости его генетического материала прямо связаны между собой. Показано, что в сбалансированной системе первоначальная реакция на стресс выражена более сильно. Но при повторном воздействии раздражителя на уже возмущенный геном повышенная изменчивость, напротив, снижает темпы дисбаланса, предохраняя, таким образом, генетический материал особи от полного разрушения. И этот процесс не зависит ни от природы стрессора, ни от их сочетаний. По происхождению изменчивость может быть разной: 1) генетически обусловленной; 2) первоначального отклика и остаточной; 3) однократно, периодически и постоянно индуцируемой; 4) на базе стимулирующей и ингибирующей реакции и др. Любой вид стресса выводит генетическую систему из равновесия (Levitt, 1980; Pitelka, 1988; Шумный, Маркель, 2000). После прекращения действия стрессора естественные механизмы отбора, нормализующие изменчивость, функционируют в жизненном цикле таким образом, что популяционный генофонд постепенно возвращается в равновесное состояние. Если же среда изменится кардинально и необратимо, то на базе выживших генотипов начнет формироваться новая генетическая система, генотипический состав которой от этапа к этапу, от поколения к поколению все больше будет приспосабливаться к ее условиям.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прослежен путь восстановления нарушенного мутагенами генофонда сосны от начала онтогенеза одного поколения до начала онтогенеза следующего поколения. Процесс приведения однократно возмущенного генофонда из состояния стресса в состояние нормы оказался гораздо продолжительнее, чем мы предполагали в начале эксперимента. Отличительной чертой 2-го опыта является то, что после обработки все критические стадии (мейоз 2001 г., эмбриогенез 2002 г., фенокритическая стадия 2003 г.) пришлись или на условия теплицы, или происходили в типичных для региона погодных условиях, что способствовало естественным механизмам коррекции его генотипического состава. Установлено, что уменьшение изменчивости признаков идет на всех этапах жизненного цикла - предэмбриональном, эмбриональном и популяционно-онтогенетическом. Этот процесс охватывает как минимум два смежных поколения - материнское и дочернее. Эти поколения связаны друг с другом или наличием или отсутствием повышенной

(остаточной) изменчивости в зависимости от того насколько изменилась за это время среда обитания. Это как "память", передающаяся новому поколению от предыдущего о состоянии условий их произрастания в прошлом, своего рода информация, характеризующая степень соответствия генофонда и внешней среды, в которой осуществлялось его формирование. Возможно, остаточная изменчивость (как "память") является одним из механизмов приспособления растений к постоянно меняющейся среде, требованием необходимым для их выживания в условиях стресса, варьирующего по силе, времени и продолжительности воздействия.

Засуха отрицательно повлияла на качество семян у деревьев как опытных, так и контрольных объектов. Наиболее устойчивыми к засухе оказались деревья, пережившие обработку химическими мутагенами в экспериментальных условиях и деревья, претерпевающие постоянный антропогенный стресс (выбросы автотранспорта) в настоящее время. Менее устойчивыми были объекты контроля, деревья которых в оптимальные годы характеризуются наиболее выровненными и высокими показателями семенной продуктивности.

Пустосемянность у сосны может возникать по разным причинам (наследственные нарушения, инбридинговая депрессия, плохие погодные условия, недоопыление и др.). В том числе в результате "освобождения" потомств от избыточной изменчивости, возникающей в генетическом материале материнского дерева в ответ на стресс, действие которого пришлось на одну из критических точек его индивидуальной жизни.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Бурлакова Е.В. Сверхслабые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы / Е.В. Бурлакова, А.А. Конрадов, Е.Л. Мальцева // Биофизика. - 2004. - Т. 49, Вып. 3. - С. 551-564.
- Буторина А.К. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной / А.К. Буторина, В.Н. Калаев, А.Н. Миронов // Экология. - 2001. - № 3. - С. 198-209.
- Гераськин С.А. Оценка методами биоиндексации техногенного воздействия на популяции *Pinus sylvestris* L. в районе предприятия по хранению радиоактивных отходов / С.А. Гераськин, В.Г. Васильев, В.Г. Дикарев и др. // Экология. - 2005. - № 4. - С. 275-285.
- Даев Е.В. О стрессе, хемокоммуникации у мышей и физиологической гипотезе мутационного процесса / Е.В. Даев // Генетика. - 2007. - Т. 43, № 10. - С. 1299-1310.
- Доклад о состоянии окружающей среды и природоохранной деятельности городского округа город Воронеж в 2005 году - Воронеж:ГУ Центр Госсанэпиднадзора, 2006. - 76с
- Животовский Л.А. «Сжатие» генотипической изменчивости при стабилизирующем отборе и ее проявление на разных стадиях онтогенеза / Л.А. Животовский, В.А. Духарев // Журн. общ. биол. - 1985. - Т. XLVI, № 1. - С. 32-40.
- Ирошников А.И. О концепции и программе генетического мониторинга популяций лесных древесных расте-

- ний / А.И. Ирошников // Лесоведение. – 2002. – № 1. – С. 58-64.
- Калашник Н.А. Хромосомные нарушения как индикатор оценки степени техногенного воздействия на хвойные насаждения / Н.А. Калашник // Экология. – 2008. – № 4. – С. 276-286.
- Кузнецова Н.Ф. Ультраструктура развивающихся семян сосны обыкновенной при самоопылении и свободном опылении (световая и электронная микроскопия) / Н.Ф. Кузнецова // Лесоведение. – 1988. – № 1. – С. 70-73.
- Кузнецова Н.Ф. Направление отбора в жизненном цикле сосны обыкновенной / Н.Ф. Кузнецова // Лесоведение. – 2003. – № 4. – С. 9-16.
- Кузнецова Н.Ф. Изменчивость потомств сосны обыкновенной в зависимости от уровня самофертильности, типа опыления и действия химических мутагенов / Н.Ф. Кузнецова, О.С. Машкина, Ю.Н. Исаков // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов: сб. ст. – Воронеж: ЦНИИЛГИС, 1993. – С. 31-40.
- Кулагин Ю.З. Индустриальная дендрология и прогнозирование / Ю.З. Кулагин. – М.: Наука, 1985. – 115 с.
- Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. – Л.: Наука, 1990. – 200 с.
- Машкина О.С. Исаков Ю.Н. Влияние химических мутагенов на изменчивость семенного потомства разных генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / О.С. Машкина, Н.Ф. Кузнецова, Ю.Н. Исаков // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: сб. ст. – Йошкар-Ола, Пущино, 2008. – С. 266-267.
- Машкина О.С. Самофертильность у сосны обыкновенной как один из механизмов ее устойчивости к химическим мутагенам / О.С. Машкина, Н.Ф. Кузнецова, Ю.Н. Исаков, А.К. Буторина // Экология. – 2009. – № 4 (в печати).
- Миркин Б.М. Современная наука о растительности / Б.М. Миркин, Л.Г. Наумова, А.И. Соломец. – М.: Логос, 2000. – 263 с.
- Муратова Е.Н. Цитологическое изучение лиственницы сибирской в антропогенно нарушенных районах г. Красноярск и его окрестностей / Е.Н. Муратова, Т.В. Карпюк, О.С. Владимирова // Вест. экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – 2009. – № 9. – С. 99-108.
- Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений / В.М. Пахомова // Цитология. – 1995. – № 1/2. – С. 66-91.
- Репродуктивные структуры голосеменных (сравнительное описание). – Л.: Наука, 1982. – 114 с.
- Романовский М.Г. Полиморфизм древесных растений по количественным признакам / М.Г. Романовский. – М.: Наука, 1994. 96 с.
- Романовский М.Г. Формирование урожая семян сосны обыкновенной в норме и при мутагенном загрязнении. / М.Г. Романовский. – М.: Наука, 1997. – 112 с.
- Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. / Г. Селье. – М.: Медицина, 1960. – 254 с.
- Судачкова Е.Н. Состояние и перспективы изучения влияния стрессов на древесные растения / Е.Н. Судачкова // Лесоведение. – 1998. – № 2. – С. 3-9.
- Тимофеев-Рессовский Н.В. Очерк учения о популяции. / Н.В. Тимофеев-Рессовский, А.В. Яблоков, Н.В. Глозов. – М.: Наука, 1973. – 277 с.
- Топильская Л.А. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах / Л.А. Топильская, С.В. Лучникова, Н.П. Чувашина // Бюл. ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1977. – Вып. 26. – С. 107-114.
- Федорков А.Л. Адаптация хвойных к стрессовым условиям Крайнего Севера. / А.Л. Федорков. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 96 с.
- Хедрик Ф. Генетика популяций. / Ф. Хедрик. – М.: Техносфера, 2003. – 592 с.
- Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. / С.С. Шварц. – М.: Наука, 1980. – 278 с.
- Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). / И.И. Шмальгаузен. – М.: Наука, 1968. – 451 с.
- Шумный В.К. Современные концепции эволюционной генетики. / В.К. Шумный, А.Л. Маркель. – Новосибирск: ИЦиГСОРАН, 2000. – 360 с.
- Andersson E. Temperature conditional irregularities in pollen mother cells of *Picea abies* (L.) Karst. / E. Andersson. // Hereditas. – 1980. – N 92. – P. 27-35.
- Barnes B.V. Selective fertilization in *Pinus monticola*. II. Results of additional tests / B.V. Barnes, R.T. Bingham, A.E. Squillace // Silvae genet. – 1962. – N 11. – P. 103-111.
- Bickham J.W. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology / J.W. Bickham, S. Sandhu, P.D.N. Hebert // Mutat. Res. – 2000. – N. 463. – P. 33-51.
- Dobbertin M. Tree growth as indicator of tree viability and of tree reaction to environmental stress: a review / M. Dobbertin // Eur. J. Forest Res. – 2005. – V. 124, N 4. – P. 319-335.
- Hall B. Organic selection: proximate environmental effects on the evolution, morphology and behavior / B. Hall // Biology and Philosophy. – 2001. – V. 16. – P. 215-237.
- Hendrichs H. On social stress in mammals / H. Hendrichs // Bielefelder Okologische Beifrage. – 1992. – B. 6. – S. 105-110.
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Chilling, freezing and high temperature stresses. / J. Levitt. – New York. Acad. Press. – 1980. – V. 1. – 497 p.
- Marchetti F. Mechanisms and consequence of paternally-transmitted chromosomal abnormalities / F. Marchetti, A.J. Wyrobek // Birth Defect. Res. – 2005. – V. 75. – P. 112-129.
- McClintock B. The significances of responses of the genome to challenge / B. McClintock // Science. – 1984. – V. 226, № 4676. – P. 792-801.
- Pitelka L.F. Evolutionary responses of plants to anthropogenic pollutants / L.F. Pitelka // Trends Ecol. Evol. – 1988. – V. 3. – P. 233-236.
- Sarvas R. Investigation of the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris* / R. Sarvas // Commun. Inst. For. Fenn. – 1962. – N 53. – 198 p.
- Stockwell W.P. Proembryonal selection in the pine / W.P. Stockwell // Forestry. – 1939. – V.37, N6. – P. 541-543.
- Wiley L.M. Impaired cell proliferation in mice that persists across at last two generations: after paternal irradiation / L.M. Wiley, J.E. Baulch, T. Straume et al. // Radiat. Res. – 1997. – V. 148. – P. 145-151.
- Wurgler F.E., Kramers P.G. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology) / F.E. Wurgler, P.G. Kramers // Mutagenesis. – 1992. – V. 7. – P. 321-327.

Поступила в редакцию 16 февраля 2010 г.  
Принята к печати 27 апреля 2011 г.