

УДК 581.331.2 : 58.04 : [634.13+634.23]

**УСТОЙЧИВОСТЬ ПЫЛЬЦЫ
ГЕНОТИПОВ ГРУШИ,
ВИШНИ И ЧЕРЕШНИ
К КАТИОНАМ СВИНЦА
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO****

Дубровский Максим Леонидович
канд. с.-х. наук
*ведущий научный сотрудник
лаборатории цитогенетики
и гаметной селекции
e-mail: element68@mail.ru*

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский
институт генетики
и селекции плодовых растений
имени И.В. Мичурина»,
Мичуринск, Россия*

Данные о влиянии катионов свинца на мужской гаметофит плодовых культур отсутствуют, что делает актуальным научное экспериментальное исследование данной проблемы. Экспериментальное изучение стрессоустойчивости мужского гаметофита плодовых растений возможно при моделировании негативных ситуаций в условиях *in vitro*. Лабораторный метод исследования прорастаемости пыльцы на искусственной питательной среде широко распространен. В ряде исследований показано, что жизнеспособность пыльцы в условиях *in vitro* существенно выше, чем *in vivo*. В своих исследованиях для экспериментального анализа хемоустойчивости мужского гаметофита мы использовали пыльцу 10 генотипов груши, 9 – вишни и 3 генотипов черешни. Анализ функциональной активности мужского гаметофита плодовых культур

UDC 581.331.2 : 58.04 : [634.13+634.23]

**RESISTANCE OF POLLEN
OF PEAR, CHERRY AND SWEET
CHERRY GENOTYPES
TO PLUMBUM CATIONS UNDER
THE CONDITIONS *IN VITRO***

Dubrovsky Maxim
Cand. Agr. Sci.
*Leading Research Associate
of Laboratory of Cito genetic
and gameto breeding
e-mail: element68@mail.ru*

*Federal State Budget
Scientific Organization
"All-Russian
Research Institute of Genetics
and Breeding of Fruit Plants
named after I.V. Michurin",
Michurinsk, Russia*

The data on influence of lead cations on men's gametophyte of fruit crops are absent and it makes urgent the scientific pilot study of this problem. Experimental studying of resistance to stress of a men's gametophyt of fruit plants is possible when modeling the negative situations under the conditions "in vitro". The laboratory method of research of pollen growing up on artificial nutrient medium is wide spreading. In a number of research it is shown that viability of pollen under the conditions "in vitro" is significantly higher, than "in vivo". In the research for the experimental analysis of a hemo resistance of a men's gametophyt we used the pollen of 10 genotypes of a pear, 9 – cherries and 3 genotypes of sweet cherries. The analysis of functional activity of a men's gametofit of fruit crops

* Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-44-03051 p_центр_a.

осуществляли по модернизированной методике Д.А. Транковского, с учетом показателя прорастаемости пыльцевых зерен на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*. При лабораторном анализе не выявлено существенного ингибирующего влияния катионов тяжелых металлов, на примере солей свинца, на функциональную активность мужского гаметофита генотипов груши, вишни и черешни. Установлен положительный эффект азотного питания в нитратной форме на прорастаемость *in vitro* пыльцевых зерен груши. Это говорит о том, что недопустим выбор нитратов токсичных металлов в качестве селективных агентов при изучении мужского гаметофита у плодовых растений. В заключении статьи отмечено, что уровень загрязненности окружающей среды химическими поллютантами существенно влияет на степень фертильности и жизнеспособности пыльцы многих видов плодовых растений, поэтому морфофизиологические показатели пыльцевых зерен, приведенные в нашем исследовании, могут служить маркерными признаками при биоиндикации территорий.

Ключевые слова: ПЫЛЬЦА, МУЖСКОЙ ГАМЕТОФИТ, ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ, ГРУША, ВИШНЯ, ЧЕРЕШНЯ

was carried out by the modernized D.A. Trankovsky's technique, taking into account an indicator of growing up of pollen grains on the artificial nutrient medium under the conditions "in vitro". The laboratory analysis did not reveal the significant inhibiting influence of cations of heavy metals, on the example of lead salts, on functional activity of men's gametophyt of genotypes of a pear, cherry and sweet cherry. The positive effect of nitric food in a nitrate form on growing up "in vitro" of pear pollen grains is established. It means that the choice of nitrates of toxic metals as selective agents when studying a men's gametophyt of fruit plants is inadmissible. In the conclusion of article is noted that the level of impurity of the environment of chemical pollyutants significantly influences on the degree of fertility and viability of pollen of many species of fruit plants, therefore the morpho-physiological indicators of pollen grains noted in our research can be the marker signs of territories bioindication.

Key words: POLLEN, MALE GAMETHOPHYTE, HEAVY METALS, PEAR, CHERRY, SWEET CHERRY

Введение. Уровень загрязненности окружающей среды химическими поллютантами существенно влияет на степень фертильности и жизнеспособности пыльцы многих видов растений, поэтому данные морфофизиологические показатели пыльцевых зерен могут служить маркерными признаками при биоиндикации территорий [1-4].

При исследовании мужской генеративной сферы популяций ивы плакучей, или вавилонской (*Salix babylonica* L.), произрастающих вдоль дорог с различным уровнем загрязнения, установлено, что действие токси-кантов проявляется в повышенном образовании стерильной пыльцы и ее низком морфофизиологическом качестве [3].

Выявлена высокая токсичность катионов Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} в диапазоне концентраций 3-100 мкМ при прорастании мужского гаметофита лилии длинноцветковой (*Lilium longiflorum* L.), что приводит к существенному снижению количества пыльцевых трубок и скорости их роста.

При действии катионов Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} и Mn^{2+} в составе хлоридов зафиксировано утолщение вершины пыльцевой трубки, на субклеточном уровне проявляющееся в аномальной организации ее клеточной стенки. Среди изученных в эксперименте тяжелых металлов только кадмий вызывал дезорганизацию клеточных органелл в области вершины пыльцевой трубки [5].

Экспериментально установлено большее негативное действие неорганических солей свинца на рост пыльцевых трубок *Lilium longiflorum* в сравнении с органическим триэтилсвинцом – при сублетальной концентрации данных соединений соответственно 6 и 50 мкМ (Roderer, Reiss, 1988). При этом триэтилсвинец вызывал аномалии роста пыльцевой трубки в широком диапазоне концентраций (25-500 мкМ), хотя катионы свинца в составе неорганических солей не приводили к вздутию вершины пыльцевой трубки даже при их высокой концентрации с явно выраженным ингибирующим эффектом. Триэтилсвинец с увеличением концентрации вызывал избирательную дезорганизацию органелл – диктиосом и кортикальных микротрубочек [6].

Свинец является опасным и широко распространенным загрязнителем окружающей среды – как антропогенных территорий, так и природных областей. Основной техногенный источник свинца в окружающей среде – выхлопные газы автомобильных двигателей, в меньшей степени – продукты сгорания органического топлива (уголь, мазут, природный газ).

Для растений свинец не является жизненно необходимым элементом, он токсичен и относится к I классу опасности. Избыток свинца в растениях связан с высокой концентрацией его катионов в составе растворимых со-

лей в почве и приводит к ингибированию дыхания, подавлению процесса фотосинтеза, в отдельных случаях вызывая увеличение содержания кадмия и снижение поступления цинка, кальция, фосфора, серы [4, 7].

Накапливаясь в пыльце, свинец способен впоследствии аккумулироваться в организме медоносных пчел, что используется при диагностике уровня антропогенного загрязнения территорий. Отмечена тенденция его большего накопления в теле пчел, обитающих вблизи промышленных зон, чем в естественных ландшафтах. При сходном уровне содержания свинца в пыльце и теле пчел на разных территориях и в различное время года выявлена большая чувствительность пчел к динамике загрязнения окружающей среды катионами свинца [8].

Установлено, что пыльца, собранная пчелами на селитебных территориях вблизи оживленных автотрасс, характеризуется повышенной токсичностью. Удаление от антропогенных источников загрязнения снижает негативное действие катионов тяжелых металлов. Так, у дикорастущего одуванчика содержание кадмия в цветках с увеличением расстояния от автомагистрали до 1 км уменьшается в 2 раза, свинца – в 3,6 [9].

Данные о влиянии катионов свинца на мужской гаметофит плодовых культур отсутствуют, что делает актуальной экспериментальное исследование данной проблемы. Экспериментальное изучение стрессоустойчивости мужского гаметофита возможно при моделировании негативных условий в условиях *in vitro*. Лабораторный метод исследования прорастаемости пыльцы на искусственной питательной среде широко распространен. В ряде исследований показано, что жизнеспособность пыльцы в условиях *in vitro* существенно выше, чем *in vivo* [10].

Объекты и методы исследований. Для экспериментального анализа хемоустойчивости мужского гаметофита использовали пыльцу 10 генотипов груши, 9 – вишни и 3 – черешни из коллекции ВНИИГиСПР

имени И.В. Мичурина. Созревшие пыльники с пылью предварительно выделяли из распускающихся бутонов, подсушивали в течение суток, затем хранили в пузырьках в эксикаторе (над обезвоженным хлоридом кальция при сохраняемой влажности воздуха около 20-25 %).

Анализ функциональной активности мужского гаметофита плодовых культур осуществляли по модернизированной методике Д.А. Транковского, учитывая показатель прорастаемости пыльцевых зерен на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*, в большинстве методик называемый также жизнеспособностью пыльцы [11].

Контрольная питательная среда для всех опытов содержала 1 % (по массе) агара, 10 % сахарозы, 0,001 % борной кислоты. При изучении действия катионов свинца Pb^{2+} на прорастаемость *in vitro* пыльцы генотипов груши (*Pyrus L.*) использовали растворимые в воде соли – нитрат свинца $Pb(NO_3)_2$ концентрацией 0,015 % (0,45 мМ) и 0,030 % (0,90 мМ) и основной ацетат свинца $Pb(CH_3COO)_2 \cdot Pb(OH)_2$ концентрацией 0,021 % (0,37 мМ). Для выявления возможного влияния азотного питания на прорастаемость пыльцы в общую схему эксперимента дополнительно включили вариант питательной среды, содержащей нетоксичный нитрат натрия при эквивалентной концентрации анионов с вариантом, содержащим 0,03 %-ный нитрат свинца. Анализ действия катионов свинца на мужской гаметофит рода *Cerasus Mill.* проведен при использовании селективной питательной среды, содержащей основной ацетата свинца.

Предметные стекла с нанесенной питательной средой и посевом пыльцы помещали в закрытые чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и культивировали в течение 3 ч в термостате при оптимальной температуре прорастания +25°C. Жизнеспособность пыльцы определяли как количество проросших пыльцевых зерен к их общему количеству в 5-7 просмотренных полях зрения препарата при среднем увеличении микроскопа (200х).

Обсуждение результатов. Установлено, что в эквимоллярных концентрациях нитрат свинца вызывает большее стимулирование способности пыльцы генотипов рода *Pyrus* L. к прорастанию *in vitro*, чем основной ацетат свинца. Также выявлен положительный эффект азотного питания в нитратной форме на прорастаемость пыльцевых зерен, что следует учитывать при лабораторном определении жизнеспособности мужского гаметофита – выбор нитратов токсичных металлов в качестве селективирующих агентов нежелателен.

Токсичный нитрат свинца в концентрации 0,015 % увеличивал количество проросшей пыльцы генотипов груши в диапазоне 1,1-2,0 раза; а с массовой долей 0,03 % – в 1,2-2,6 раз; при этом нетоксичный нитрат натрия оказывал стимулирование прорастаемости в 1,1-2,2 раза (рис. 1).

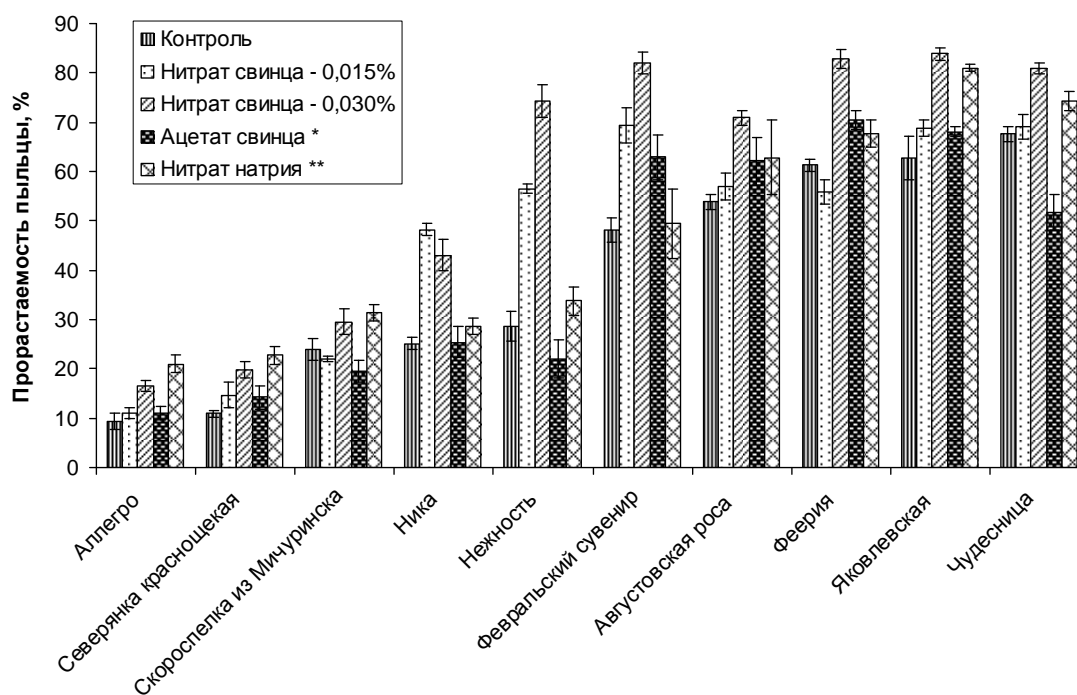


Рис. 1. Прорастаемость пыльцы *in vitro* генотипов рода *Pyrus* L. в условиях действия катионов свинца Pb^{2+} .

Примечание: * - концентрации катионов Pb^{2+} в питательных средах с основным ацетатом свинца и 0,03 %-ным нитратом свинца эквимоллярны; ** - концентрации нитрат-анионов в питательных средах с нитратом натрия и 0,03 %-ным нитратом свинца эквимоллярны

Ингибирующий эффект катионов свинца на прорастаемость пыльцы изучаемых генотипов отмечен на достоверном уровне на питательной среде, содержащей основной ацетат свинца, для сортов груши Скороспелка из Мичуринска, Нежность и Чудесница, у которых зафиксировано 1,2-1,3-кратное снижение жизнеспособности пыльцы.

Незначительное снижение прорастаемости пыльцевых зерен (в 1,1 раза) обнаружено у сорта Феерия на среде с 0,015 %-ным нитратом свинца, при этом среда с его массовой долей 0,03 % характеризовалась только стимулирующим эффектом действия на мужской гаметофит (рис. 2).

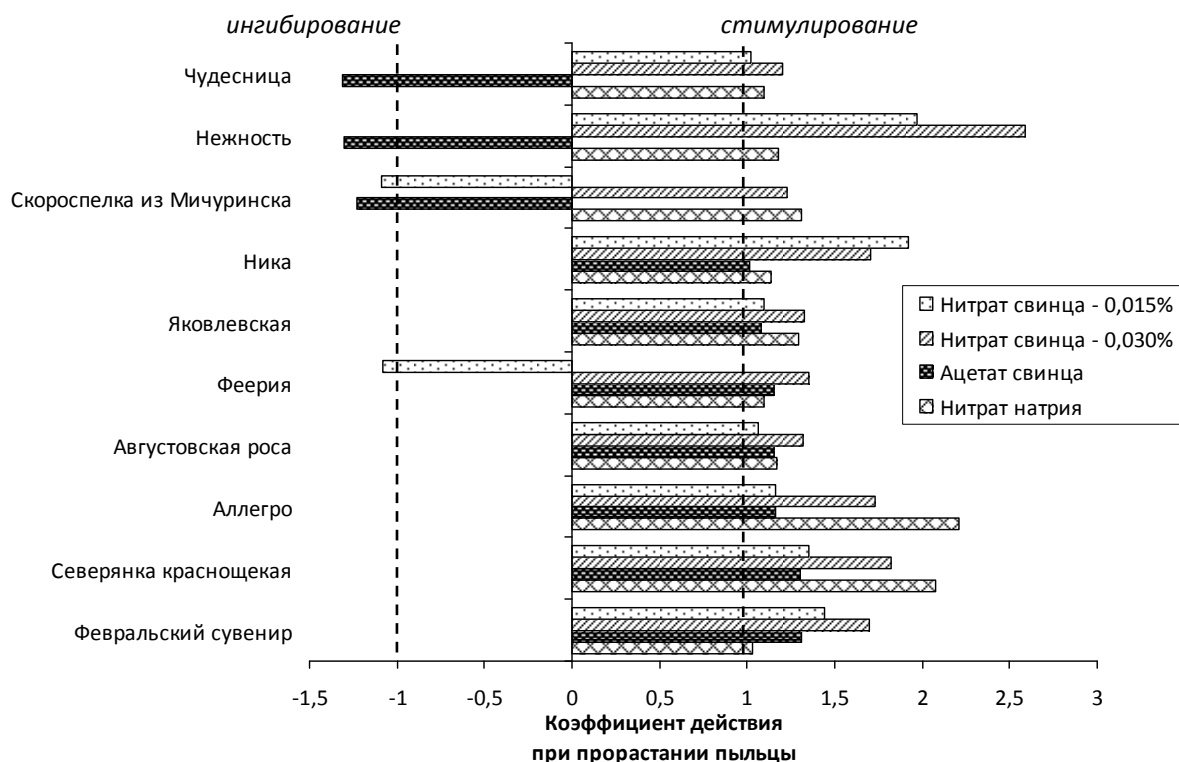


Рис. 2. Степень действия катионов свинца Pb^{2+} на прорастаемость *in vitro* пыльцы генотипов рода *Pyrus* L.

Установлены высокие положительные корреляции на уровне +0,80...+0,98 между абсолютными значениями жизнеспособной пыльцы груши, зафиксированными для каждого генотипа на питательных средах различного состава (табл. 1).

Однако сравнение коэффициентов удельной прорастаемости пыльцы на трех разных средах с катионами свинца (относительно значений контроля) среди выборки генотипов рода *Pyrus* L. выявило среднюю положительную корреляцию на уровне +0,59 только для сред с двумя концентрациями нитрата свинца, что связано с отмеченным разнонаправленным эффектом действия данного тяжелого металла – стимулирования или ингибирования.

Таблица 1 – Матрица корреляций абсолютных значений жизнеспособности пыльцы в условиях *in vitro*, зафиксированных для каждого генотипа рода *Pyrus* L. на разных питательных средах

Вариант	Контроль	Нитрат свинца - 0,015 %	Нитрат свинца - 0,030 %	Ацетат свинца	Нитрат натрия
Контроль	1				
Нитрат свинца - 0,015%	0,87	1			
Нитрат свинца - 0,030%	0,90	0,96	1		
Ацетат свинца	0,93	0,81	0,86	1	
Нитрат натрия	0,98	0,80	0,84	0,91	1

Изучение действия катионов свинца Pb^{2+} на мужской гаметофит рода *Cerasus* Mill. проведено при добавлении в стандартную питательную среду основного ацетата свинца концентрацией 0,021% (0,37 мМ).

Наибольшее ингибирование прорастаемости пыльцы (в 2 раза) отмечено для сорта черешни Фея, средняя степень прорастания пыльцы (ингибирование в 1,2-1,4 раз) – у сортов Жуковская, Харитоновская, Комсомольская. Эффект стимулирования роста пыльцевых трубок катионами свинца Pb^{2+} выявлен только у падоцерусов Луч и ВБК 10-3 – в 1,4 и 1,6 раз соответственно (рис. 3, 4).

Коэффициент корреляции абсолютных значений проросшей пыльцы на контрольной и селективной питательных средах у генотипов рода *Cerasus* Mill. составил +0,93.

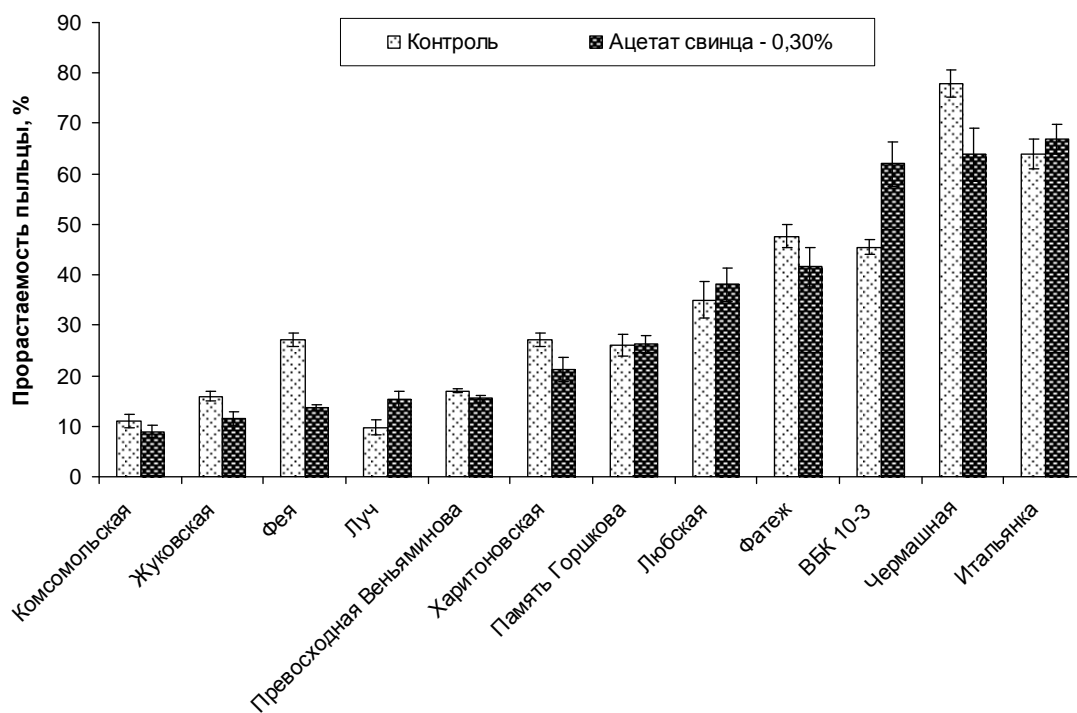


Рис. 3. Прорастаемость пыльцы *in vitro* генотипов рода *Cerasus* Mill. в условиях действия катионов свинца Pb^{2+}

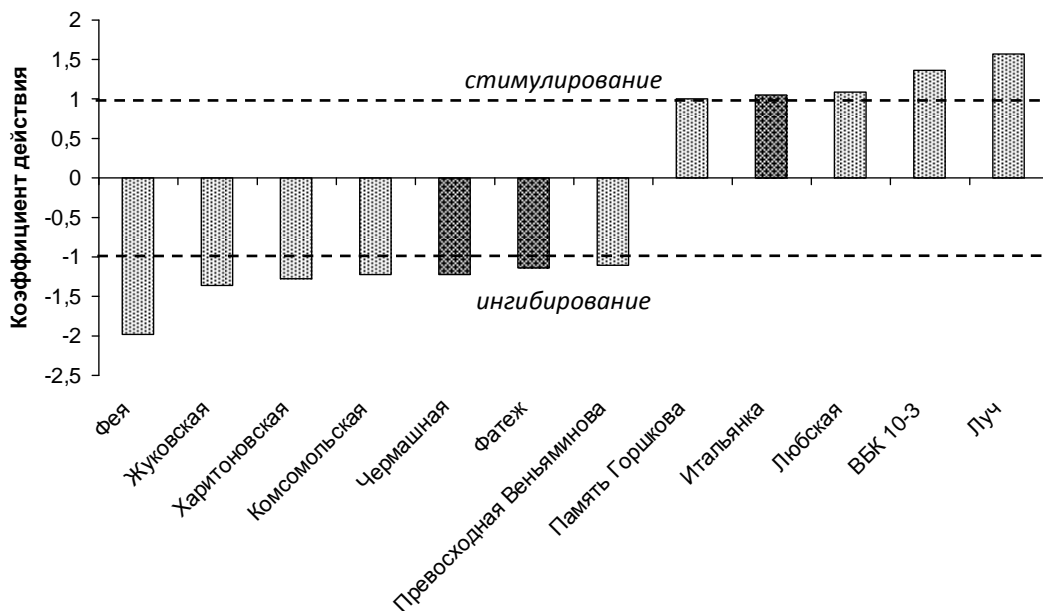


Рис. 4. Степень действия катионов свинца Pb^{2+} на прорастаемость пыльцы *in vitro* генотипов рода *Cerasus* Mill. (темной штриховкой выделены сорта черешни)

Установлено, что для обоих родов *Pyrus L.* и *Cerasus Mill.* генотипический компонент оказывает более существенное влияние на величину прорастаемости пыльцы *in vitro*, чем селективная питательная среда при экспериментально созданных условиях действия катионов свинца (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа прорастаемости пыльцы в условиях натриево-хлоридного стресса при культивировании *in vitro*

Источник вариации	SS	df	MS	F	P-Значение	F критич.
Род <i>Pyrus L.</i>						
Генотипы	19511,22	9	2167,91	30,57	$6,79 \cdot 10^{-12}$	2,25
Условия культивирования *	2280,71	3	760,24	10,72	$8,14 \cdot 10^{-5}$	2,96
Погрешность	1915,04	27	70,93			
Итого	23706,97	39				
Род <i>Cerasus Mill.</i>						
Генотипы	9877,23	11	897,93	25,90	$2,85 \cdot 10^{-6}$	2,82
Условия культивирования **	14,75	1	14,75	0,43	0,53	4,84
Погрешность	381,30	11	34,66			
Итого	10273,28	23				

Примечание: * - для контроля и трех селективных сред с катионами свинца;

** - для одной селективной среды с катионами свинца

В целом, полученные данные косвенно подтверждают кумулятивный характер действия тяжелых металлов на растительные ткани [12]. При прорастании пыльцы негативное влияние свинца оказывается недостаточным для существенного ингибирования ее жизнеспособности из-за малого времени действия. Однако при более длительном процессе формирования мужского гаметофита вызываемый тяжелыми металлами стресс способен приводить к значительным нарушениям мейотического деления, что отмечается у многих видов растений и используется при биоиндикации промышленно загрязненных территорий.

Выводы. Проведен лабораторный анализ устойчивости мужского гаметофита родов *Pyrus* L. и *Cerasus* Mill. при прорастании *in vitro* к действию растворимых соединений свинца. Выявлен положительный эффект азотного питания в нитратной форме на прорастаемость *in vitro* пыльцевых зерен, поэтому выбор нитратов токсичных металлов в качестве селективных агентов недопустим.

Установлено, что в эквимольных концентрациях нитрат свинца вызывает большее стимулирование прорастающей способности пыльцы генотипов груши, чем основной ацетат свинца. Вследствие кратковременного действия в течение 2-3 ч при росте пыльцевых трубок токсичные соли свинца не вызывают существенного ингибирования жизнеспособности пыльцы плодовых культур, лишь у отдельных генотипов снижая количество проросшей пыльцы в 1,2-2,0 раза.

Литература

1. Викулов, С.В. Индикация загрязнения окружающей среды с помощью пыльцы рябины обыкновенной / С.В. Викулов, Е.В. Шабанова // Вестник ТГУ. – 2007. – Т. 12, вып. 6. – С. 687-688.
2. Дзюба, О.Ф. Палиноиндикация качества окружающей среды / О.Ф. Дзюба. – СПб., 2006. – 198 с.
3. Ибрагимова, Э.Э. Палиноморфологическая и палинотоксическая оценка аэротехногенного загрязнения в урбоэкосистемах / Э.Э. Ибрагимова // Самарский научный вестник. – 2015. – Вып. № 2 (11). – С. 83-86.
4. Крутских, Н.В. Загрязнение почв г. Петрозаводска тяжелыми металлами и некоторые аспекты палиноиндикации / Н.В. Крутских, Н.Б. Лаврова // Геология и полезные ископаемые. – 2010. – Вып. 13. – С. 153-157.
5. Sawidis, T. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure / T. Sawidis, H.-D. Reiss // Protoplasma. – 1995. – Vol. 185, Is. 3. – P. 113-122.
6. Roderer, G. Different effects of inorganic and triethyl lead on growth and ultrastructure of lily pollen tubes / G. Roderer, H.-D. Reiss // Protoplasma. – 1988. – Vol. 144, Is. 2. – P. 101-109.
7. Титов, А.Ф. Тяжелые металлы и растения: монография / А.Ф. Титов, Н.М. Казнина, В.В. Таланова; отв. ред. Н.Н. Немова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.
8. Lambert, O. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination / O. Lambert, M. Piroux, S. Puyo [et al.] // Environmental Pollution. – 2012. – Vol. 170. – P. 254-259
9. Еськова, М.Д. Факторы, влияющие на накопление тяжелых металлов медоносной растительностью и телом пчел / М.Д. Еськова, Л.В. Серая // Вестник Российского государственного аграрного заочного университета. – 2013. – Т. 19. – № 14. – С. 62-66.

10. Srinivasan, A. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function / A. Srinivasan, N.P. Saxena, C. Johansen // *Field Crops Research*. – 1999. – Vol. 60. – P. 209-222.

11. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Колос, 1974. – 288 с.

12. Ernst, W.H.O. The effect of lead contamination of soils and air on its accumulation in pollen / W.H.O. Ernst, W.B. Bast-Cramer // *Plant and Soil*. – 1980. – Vol. 57, Is. 2. – P. 491-496.

References

1. Vikulov, S.V. Indikacija zagrzaznenija okruzhajushhej sredy s pomoshh'ju pyl'cy rjabiny obyknovennoj / S.V. Vikulov, E.V. Shabanova // *Vestnik TGU*. – 2007. – T. 12, vyp. 6. – S. 687-688.

2. Dzjuba, O.F. Palinoidikacija kachestva okruzhajushhej sredy / O.F. Dzjuba. – SPb., 2006. – 198 s.

3. Ibragimova, Je.Je. Palinomorfologicheskaja i palinotoksicheskaja ocenka ajerotehnogennogo zagrzaznenija v urbojekosistemah / Je.Je. Ibragimova // *Samarskij nauchnyj vestnik*. – 2015. – Vyp. № 2 (11). – S. 83-86.

4. Krutskih, N.V. Zagrzaznenie pochv g. Petrozavodskaja tjazhelymi metallami i nekotorye aspekty palinoidikacii / N.V. Krutskih, N.B. Lavrova // *Geologija i poleznye iskopaemye*. – 2010. – Vyp. 13. – S. 153-157.

5. Sawidis, T. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure / T. Sawidis, H.-D. Reiss // *Protoplasma*. – 1995. – Vol. 185, Is. 3. – P. 113-122.

6. Roderer, G. Different effects of inorganic and triethyl lead on growth and ultrastructure of lily pollen tubes / G. Roderer, H.-D. Reiss // *Protoplasma*. – 1988. – Vol. 144, Is. 2. – P. 101-109.

7. Titov, A.F. Tjazhelye metally i rastenija: monografija / A.F. Titov, N.M. Kaznina, V.V. Talanova; otv. red. N.N. Nemova. – Petrozavodsk: Karel'skij nauchnyj centr RAN, 2014. – 194 s.

8. Lambert, O. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination / O. Lambert, M. Piroux, S. Puyo [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2012. – Vol. 170. – P. 254-259

9. Es'kova, M.D. Faktory, vlijajushhie na nakoplenie tjazhelyh metallov medonosnoj rastitel'nost'ju i telom pchel / M.D. Es'kova, L.V. Seraja // *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo agrarnogo zaochnogo universiteta*. – 2013. – T. 19. – № 14. – S. 62-66.

10. Srinivasan, A. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function / A. Srinivasan, N.P. Saxena, C. Johansen // *Field Crops Research*. – 1999. – Vol. 60. – P. 209-222.

11. Pausheva, Z.P. Praktikum po citologii rastenij / Z.P. Pausheva – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Колос, 1974. – 288 с.

12. Ernst, W.H.O. The effect of lead contamination of soils and air on its accumulation in pollen / W.H.O. Ernst, W.B. Bast-Cramer // *Plant and Soil*. – 1980. – Vol. 57, Is. 2. – P. 491-496.