

И. О. БАЙТУЛИН¹, Н. А. ХАЙЛЕНКО², А. М. НУРУШЕВА¹

(¹РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК, Алматы, Республика
Казахстан,

²РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, Алматы, Республика
Казахстан)

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН
У ВИДА *KOELERIA CRISTATA* (L.) PERS. НА ПЛОЩАДКАХ БЫВШЕГО
СЕМИПАЛАТИНСКОГО ПОЛИГОНА**

Аннотация. В работе показаны результаты исследований формирования пыльцевых зерен у *Koeleria cristata* (L.) Pers. – Тонконог гребенчатый. Установлено, что на процессы формирования пыльцевых зерен оказывает влияние радиация, а также, вероятно, отсутствие достаточного количества атмосферных осадков в период формирования мужского гаметофита.

Ключевые слова: вид, радиация, пыльцевое зерно, мужской гаметофит.

Кілт сөздер: түр, радиация, тозаң дәндері, еркектік гаметофит.

Keyword: species, radiation, pollen grain, man's gametophyte.

Введение. Процесс индуцированного, в данном случае радиационного мутагенеза, является очень сложным и тесно связанным, прежде всего, с клеточным метаболизмом. Степень поражения радиацией генетического аппарата основывается на трех взаимосвязанных процессах: а) физи-ческих особенностях разных видов ионизирующих излучений, дающих разную микрогеометрию энергии в клетке и в первую очередь разную линейную потерю энергии; б) условиях в момент и после облучения; в) эволюционных, видовых и индивидуальных различий в системе естественной защиты (Дубинин, 1976).

Важны также и системы репарации в клетках как соматических, так и в половых, которые у высших растений начинают работать сразу же, как только клетки вида попадают под излучение, т.е. с одной стороны – воздействие ионизирующего излучения на хромосомный и клеточный ап-параты клетки, а с другой стороны – мощные системы репарации.

К сожалению, по Семипалатинскому полигону почти нет научных работ по радиоактивному загрязнению, по которым можно было бы провести сравнительный анализ данных, полученных 30 лет назад и современных данных.

Но такие данные есть по Чернобылю, в основном, по лесным массивам. Лес может задерживать, аккумулировать и перераспределять по своим компонентам поглощенные им радионуклиды, но сам по себе не способен нейтрализовать поглощенную им радиоактивность. Ее можно частично блокировать специально построенной для этой цели динамической «биологической перегородкой» (Ипатьев В.А. 2003).

Белорусские ученые работают не только с дикорастущей флорой, но и с сельскохозяйственными угодьями, подвергшимися радионуклидному заражению. Такая работа ведется, главным образом, для практических целей – подбираются и всесторонне изучаются виды растений, способные противостоять радиоактивному загрязнению (Самошкин, Глазун, 2003); разрабатываются специальные агротехнологии и агромелиоративные мероприятия возделывания лесных культур на радиоактивно загрязненных сельскохозяйственных землях (Ратников, Жигарева, Попова, Петров, Шаповалов, 2002; Копытков, Рудаковская, 2003; Жигарева, Ратников, Алексахин, Попова, Петров, Белоус, Куриленко, 2003; Глазун, Алешин, 2003 и др.). Во всех работах четко прослеживаются действие двух лимитирующих факторов – радиации и воды.

Однако работы по цитогенетическому изучению растений в зоне загрязнений Чернобыльской АЭС также единичны.

По мере возрастания концентрации радионуклидов в почве и семенах прослеживается тенденция к увеличению частоты хромосомных aberrаций, нагруженности клеток, в основном фрагментами и возрастанием частоты отставания хромосом при расхождении их к полюсам делящихся клеток. Для всех исследуемых видов дикорастущих растений из состава флоры Полесского государственного радиационно-экологического заповедника отмечено достоверное увеличение выхода aberrантных клеток по сравнению с контрольными популяциями (Гончарова, 2000). На основании проведенных исследований автор этой работы предполагает, что выбранные виды растений могут выступать в качестве **биосферных тест-систем**, которые могут обеспечивать слежение за темпом мутирования в растительных популяциях и приносить информацию о степени риска для фитоценозов, подвергшихся экологическому загрязнению.

В настоящее время также предполагают, что и у низших, и у высших организмов существуют системы *эпигенетического* контроля за проявление тех или иных признаков, как в клетке, так и в организме, в том числе и признака устойчивости к определенному виду воздействия на живой организм. Однако механизмы проявления такого эпигенетического контроля пока весьма спорны.

От степени семяношения зависит самовозобновление растительности. Образование же семян зависит от нормального развития пыльцевых зерен. Чем больше растение продуцирует фертильных пыльцевых зерен, тем больше вероятность нормального развития мужского гаметофита и формирования семян. На процесс развития пыльцевых зерен, как и самого развития растений в целом, существенное влияние оказывают влагообеспеченность, радиационные факторы и др.

В растительном покрове территорий Семипалатинского бывшего ядерного полигона одним из важных доминантных видов является *Koeleria cristata* (L.) Pers. Поэтому нами было проведено цитогенетическое изучение развития пыльцевых зерен этого вида на площадках с разной степенью остаточной радиации.

Материал и методы исследований

Koeleria cristata (L.) Pers. (Тонконог гребенчатый) – соцветие метелка. Метелка цилиндричес-кая, более или менее лопастная. Колоски 2-5 цветковые, на участке с высоким МЭД излучением длина колоса составила – 58 мм, а ширина – 4,6 мм, количество колосков – 16,3, на контрольном участке длина колоса – 63,6 мм, а ширина – 5,3 мм, количество колосков – 17,7. Колосковые чешуи неравные, верхняя равна цветковым или длинее их, туповатые, голые или едва опушенные, нижняя колосковая чешуя ланцетная. Длина нижней колосковой чешуи на загрязненном участке – 4,8 мм, на контрольном участке – 4,0 мм (таблица 1).

Таблица 1 – Морфометрия колоса *Koeleria cristata* (L.) Pers. – Тонконог гребенчатый

Название растения	Участки	Длина колосковой чешуи, мм	Длина колоса, мм	Ширина колоса, мм	Количество колосков, мм
<i>Koeleria cristata</i>	Контроль	4,0 ±0,1	63,6±4,3	5,3±0,8	17,7±2,8
	Загрязненный	4,8±0,2	58,0±5,5	4,6±0,8	16,3±2,0

Для цитогенетических исследований был собран материал на территории бывшего Семипалатинского испытательного ядерного полигона: метелки, предположительно с семенами исследуемого вида *Koeleria cristata* (L.) Pers. – Тонконога гребенчатого, а также молодые метелки, не вышедшие из влагалища верхнего листа.

Координаты загрязненных и чистых участков и радиометрия приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Пробы растений, отобранных на цитогенетический анализ на территориях бывшего Семипалатинского испытательного полигона и на контрольных площадках

Вид	Код	Значения МЭД	Плотность β-	Координаты		Место отбора
				N	E	

растения	ИРБЭ-2006	γ-излучения,	частиц/мин			
<i>Koeleria cristata</i> (L.) Pers.	К-IV-19-0-27	мкР/ч 13	см ² <10	50*12'24, 7"	79*29'11, 3"	Семипалатинская обл., контрольный участок «Чайковка», предгорья Семейтау
	Б-II-19-0-23	500	367	49*56'11, 3"	79*00'15, 8"	Балапан, Атомное озеро, западная часть отвалов
	Б-I-19-0-22	985	370	49*56'12, 7"	79*00'19, 1"	Балапан, Атомное озеро, западная часть отвалов

Материал – молодые метелки, не вышедшие из влагалища верхнего листа, фиксировали в утренние часы в свежеприготовленном реактиве Карнуа (3 части 96%-ного этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты), где и хранили 12-24 часа. Затем материал промывали в 96%-ном этиловом спирте – 1 час, 80%-ном этиловом спирте I – 1 час, 80%-ном этиловом спирте II – 1 час, 70%-ном этиловом спирте I – 1 час, 70%-ном этиловом спирте II – 1 час, 70%-ном этиловом спирте III – 1 час и оставляли на хранение в свежей порции 70%-ного этилового спирта.

Окрашивание материала – цветков и пыльников с микроспорами – проводили в 2%-ном растворе ацетокармина, приготовленном по стандартной методике для окраски микроспоридий у злаков. (Паушева, 1978). При анализе учитывали интенсивность окраски всех структур цветков и пыльников, а также подсчитывали количество клеток микроспоридий с нормальным течением мейоза и с различными нарушениями процессов мейоза. Кроме того, подсчитывали количество нормально окрашенных (фертильных) пыльцевых зерен и неокрашенных (стерильных) пыльцевых зерен в 100 полях зрения микроскопа «MICROS».

Все картины мейоза, а также цветки, пыльники и пыльцевые зерна фотографировали с помощью видеокамеры YONGXIN OPTICS CAM V200 и компьютерной программы YONGXIN OPTICS ScopePhoto версии 2.4.

Таблица 3 – Характеристика пыльцевых зерен у растений вида *Koeleria cristata* (L.) Pers. –

Тонконог гребенчатый, растущих на площадках Семипалатинского полигона

Вид растения	Уровень МЭД	Код ИРБЭ-2006	Место сбора	Количество пыльцевых зерен				
				общее количество	фертильных		стерильных	
					кол-во	%	кол-во	%
<i>Koeleria cristata</i> (L.) Pers. – Тонконог гребенчатый								

Г-9	контроль	К-IV-19-0-27	Чайковка, предгорья Семей-тау	4136	4068	98,36	68	1,64
Г-15	средний уровень МЭД	Б-II-19-0-23	Балапан, Атомное озеро, западная часть отвалов	5751	5746	99,91	5	0,087
Г-12	высокий уровень МЭД	Б-I-19-0-22	Балапан, Атомное озеро, западная часть отвалов	4749	4567	96,17	182	3,83

Результаты исследований

Площадка Г-9. Код ИРБЭ (К-IV-19-0-27), МЭД γ -излучения 13 мкР/ч, плотность β -час-тиц/мин <10 на $см^2$ – контроль. У растений *Koeleria cristata* (L.)Pers. на контрольной площадке происходит нормальное развитие всех структур цветка, в том числе как в фертильных, так и в стерильных пыльцевых зернах. В пыльнике соотношение фертильных и стерильных зерен составляет 98,36 и 1,64% соответственно (таблица 2, рисунки 1, 2).

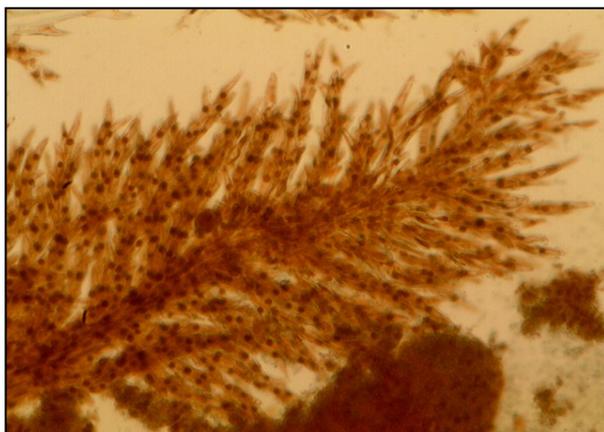


Рисунок 1 – Лопасть рыльца

у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers.

Рисунок 2 – Фертильные пыльцевые зерна

у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers.

В одном пыльнике насчитывается до 2000 фертильных пыльцевых зерен. Завязь в цветке хорошо развитая. Но в ткани тапетума наблюдается выпячивание цитоплазматических мембран в виде «бусинок» по краям клеток.

Даже в самых маленьких цветках наблюдаются хорошо развитые пыльники со зрелой пылью.

Площадка Г-15. Код ИРБЭ (Б-П-19-0-23). МЭД γ -излучения 500мкР/ч, плотность β -час-тиц/мин 367 на см² – средний уровень МЭД. У растений, растущих на площадках со средним уровнем МЭД, имеются как нормально развитые цветки, с нормально развитыми пыльниками, так и недоразвитые цветки, у которых отсутствовали почти все компоненты женского и мужского гаметофита. Пыльники крошечные, слабо окрашенные, а пыльцевые зерна крупные, фертильные, хорошо окрашенные, многие пыльцевые зерна были с плазмолизом.

От общего количества пыльцевых зерен с плазмолизом фертильные составили – 97,17%; стерильные – 2,83%.

В ткани тапетума наблюдается выпячивание цитоплазматических мембран, тоже в виде «бусинки» по краям клеток.

Соотношение количества фертильных и стерильных зерен составляет 99,91 и 0,087%, соответственно (таблица 2, рисунки 3, 4).

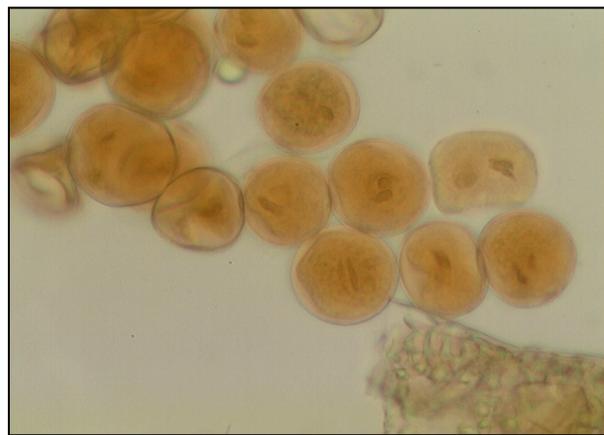


Рисунок 3 – Пыльцевые зерна с
плазмолизом
у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers.

Рисунок 4 – Пыльцевые зерна со спермиями
у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers.

Площадка Г-12. Высокий уровень МЭД (Б-І-19-0-22). У растений, растущих на площадках с высоким уровнем МЭД, женский и мужской гаметофиты хорошо развиты. Фертильные пыльцевые зерна нормальные, хорошо окрашенные, со спермиями. А пыльники прозрачные, есть и стерильные, но стерильных пыльцевых зерен очень мало, чаще всего внутри пыльников – конгломераты из слипшихся стерильных пыльцевых зерен. Количество фертильных и стерильных пыльцевых зерен достигало, соответственно, 96,17 и 3,83% (см. таблицу 2). По нашему мнению, это может свидетельствовать о том, что вид *Koeleria cristata* (L.) Pers. является устойчивым к действию высоких доз радиации. Однако данный факт требует дополнительной проверки. При высоких дозах МЭД, семена всех растений не созревают, погибают, и восстановление растительности происходит за счет заноса семян этого вида с других площадок, но в этом случае растут уже другие генотипы.

ВЫВОДЫ:

1. Лимитирующими факторами для развития растений и восстановления естественного растительного покрова на площадках бывшего Семипалатинского ядерного полигона являются разные виды **ионизирующих излучений**, а также недостаток влаги.

2. Созревания семян у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers. при средних и высоких уровнях МЭД не происходит.

3. При средних и высоких уровнях МЭД, вероятно, происходит **ежегодное** обновление злаковых растений за счет заноса жизнеспособных семян из других районов произрастания *Koeleria cristata* (L.)Pers.



Рисунок 5 – Фертильное пыльцевое зерно со спермиями у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers.



Рисунок 6 – Стерильное пыльцевое зерно у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers.

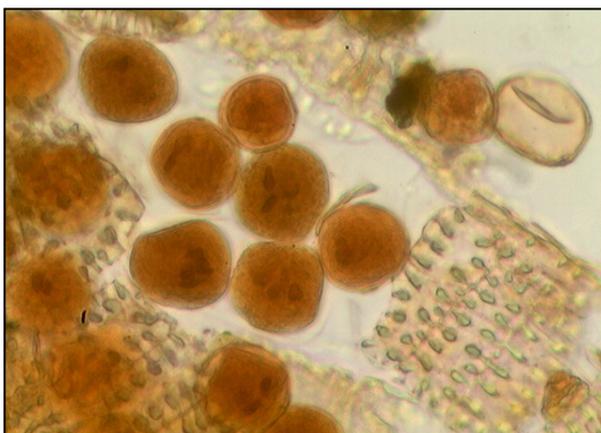


Рисунок 7 – Фертильные пыльцевые зерна со спермиями и стерильное пыльцевое зерно у вида *Koeleria cristata* (L.)Pers. Клетки тапетума представлены структурами с «бусинками»

4. У вида *Koeleria cristata* (L.)Pers. под действием ионизирующего облучения и других сопутствующих факторов идет накопление каких-то новых признаков в так называемом «**фенотипическом окне генома**».

5. **Генотипические** различия в системе естественной защиты видов играют, несомненно, **главную** роль в процессах восстановления естественного растительного покрова бывшего Семипалатинского ядерного полигона.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Дубинин Н.П. Общая генетика: М.: Наука, 1976. 590 с.
- 2 Ипатьев В.А. Радиоэкологический «феномен» леса // Лес в жизни восточных славян от Киевской Руси до наших дней: сборник научных трудов. – Гомель, 2003. – Вып. 57. – С. 155-156.
- 3 Самошкин Е.Н., Глазун И.Н. О вариабельности посевных качеств семян сосны в течение последних 11 лет после аварии на ЧАЭС // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения): сборник научных трудов. – Гомель, 2003. – Вып. 59. – С. 239-242.
- 4 Ратников А.Н., Жигарева Т.Л., Попова Г.И., Петров К.В., Шаповалов В.Ф. Влияние агроメリоративных меро-приятий на урожайность сельскохозяйственных и кормовых культур и накопление цезия-137 // Бюллетень ВИАУ. – 2002. – № 116. – С. 496-499.
- 5 Копытков В.В., Рудаковская Л.В. Опыт создания лесных культур различными способами на радиоактивно загрязненных сельскохозяйственных землях // Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов. – Гомель, 2003. – Вып. 56. – С. 23-31.
- 6 Жигарева Т.Л., Ратников А.Н., Алексахин Р.М., Попова Г.И., Петров К.В., Белоус Н.М., Куриленко А.Т. Влияние технологических приемов возделывания сельскохозяйственных культур на накопление ^{137}Cs в урожае // Агрехимия. – 2003. – № 10. – С. 67-74.
- 7 Глазун И.Н., Алешин И.В. Посевные качества семян ели европейской и радиоактивно загрязненных насаждениях Брянской области // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения): сборник научных трудов. – Гомель, 2003. – Вып. 59. – С. 189-192.

8 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1978. – 256 с.

REFERENCES

- 1 Dubinin N.P. Obshchaia genetika. M.: Nauka, 1976. 590 s.
- 2 Ipat'ev V.A. Radioekologicheskii "fenomen" lesa. Les v zhizni vostochnykh slavian ot Kievskoi Rusi do nashikh dnei: sbornik nauchnykh trudov. Gomel', 2003. Vyp. 57. S. 155-156.
- 3 Samoshkin E.N., Glazun I.N. O variabel'nosti posevnykh kachestv semian sosny v techenie poslednikh 11 let posle avarii na ChAES. Seleksiia, geneticheskie resursy i sokhranenie genofonda lesnykh drevesnykh rastenii (Vavilovskie chteniia): sbornik nauchnykh trudov. Gomel', 2003. Vyp. 59. S. 239-242.
- 4 Ratnikov A.N., Zhigareva T.L., Popova G.I., Petrov K.V., Shapovalov V.F. Vliianie agromeliorativnykh meropriiatii na urozhainost' sel'skokhoziaistvennykh i kormovykh kul'tur i nakoplenie tseziia-137. Biulleten' VIUA. 2002. № 116. S. 496-499.
- 5 Kopytkov V.V., Rudakovskaia L.V. Opyt sozdaniia lesnykh kul'tur razlichnymi sposobami na radioaktivno zagriaznennykh sel'skokhoziaistvennykh zemliakh. Problemy lesovedeniia i lesovodstva: sbornik nauchnykh trudov. Gomel', 2003. Vyp. 56. S. 23-31.
- 6 Zhigareva T.L., Ratnikov A.N., Aleksakhin R.M., Popova G.I., Petrov K.V., Belous N.M., Kurilenko A.T. Vliianie tekhnologicheskikh priemov vozdeystviia sel'skokhoziaistvennykh kul'tur na nakoplenie ¹³⁷Cs v urozhae. Agrokhimii. 2003. № 10. S. 67-74.
- 7 Glazun I.N., Aleshin I.V. Posevnye kachestva semian eli evropeiskoi i radiativno zagriaznennykh nasazhdeniiakh Brianskoi oblasti. Seleksiia, geneticheskie resursy i sokhranenie genofonda lesnykh drevesnykh rastenii (Vavilovskie chteniia): sbornik nauchnykh trudov. Gomel', 2003. Vyp. 59. S.189-192.
8. Pausheva Z.P. Praktikum po cytologii rastenii. M.: Kolos, 1978. 256 s.

Резюме

И. О. Байтулин, Н. А. Хайленко, А. М. Нұрышева

(¹ҚР БҒМ ҒК «Ботаника және фитоинтродукция институты» РМҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы,

(²ҚР БҒМ ҒК «Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты» РМҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы)

БҰРЫНҒЫ СЕМЕЙ ПОЛИГОНЫ АЛАҢДАРЫНДАҒЫ *Koeleria cristata* (L) Pers.
ӨСІМДІГІНІҢ

ТОЗАҢ ДӘНДЕРІНІҢ ҚАЛЫПТАСУ ҮДЕРІСІН ЦИТОГЕНЕТИКАЛЫҚ ЗЕРТТЕУ

Бұрынғы Семей полигоны алаңдарында кең таралған *Koeleria cristata* (L.) Pers. өсімдігінің тозаң дәнде-рінің дамып қалыптасу үдерісіне қалдық радиацияның әсері тексерілді. Орта мөлшердегі радиация қалдығы бар алаңда өсімдік тұқым бермейді. Себебі, тозаң дәндері дамып қалыптаспайды, онда плазмоллиз көп орын алып, стерильді тозаңдар саны арта түседі.

Тірек сөздер: түр, радиация, тозаң дәндері, еркектік гаметофит.

Summary

I. O. Baitulin, N. A. Chailenko, A. M. Nurusheva

(¹Institute of Botany and Phytointroduction, SC MES RK, Almaty, Republic of Kazakhstan)

(²RSE «Institute of Plant Biology and Biotechnology» SC MES RK, Almaty, Republic of Kazakhstan)

CYTOGENETIC RESEARCH THE PROCESS FORMING OF *Koeleria cristata*'s (L) Pers.
POLLEN

ON THE FORMER SEMIPALATINSK GROUND

The pollen's forming process of *Koeleria cristata* (L.) Pers. does investigated on the ground of the Semipalatinsk proving ground. On the ground with medium residual radiation the seeds does not forming. Because the pollens became with plasmolisis, and sterile pollens increased.

Keywords: species, radiation, pollen grain, man's gametophyte.

Поступила 05.09.2013 г.