

УДК 504.5:669.2/.8+574.3:581

СТРАТЕГИИ АДАПТАЦИИ *DESCHAMPSIA CAESPITOSA* И *LYCHNIS FLOS-CUCULI* К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ: АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ ЗАВИСИМОСТИ ДОЗА–ЭФФЕКТ

© 2013 г. О. В. Дуля, В. С. Микрюков, Е. Л. Воробейчик

Институт экологии растений и животных УрО РАН

620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

e-mail: lesyadulya@gmail.com

Поступила в редакцию 18.10.2012 г.

В широком диапазоне концентраций Cu (0.006–0.51 мг/л) с помощью корневого теста исследована реакция на внесение металла в питательную среду вегетативного потомства материнских растений щучки дернистой (*Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv.) и горичвета обыкновенного (*Lychnis flos-cuculi* L.), совместно произрастающих как в фоновых районах, так и в условиях длительного загрязнения выбросами Среднеуральского медеплавильного завода. С помощью мультимодельного подхода индивидуально для каждого из 85 материнских растений построены зависимости доза–эффект и оценены их параметры (эффективные концентрации, наклон линейного участка кривой). Характер трансформации дозовой зависимости при переходе от фоновых популяций к импактным кардинально различается у исследуемых видов: у *L. flos-cuculi* наблюдается “параллельный перенос”, при котором форма кривой не меняется, тогда как у *D. caespitosa* снижается чувствительность к Cu, а устойчивость увеличивается только в области максимальных концентраций. Это свидетельствует о различии стратегий адаптации к тяжелым металлам, которые обсуждаются на основе сравнения физиологических и экологических свойств видов.

Ключевые слова: *Lychnis*, *Deschampsia*, *Silene*, корневой тест, популяция, адаптация, устойчивость, чувствительность, зависимость доза–эффект, эффективные концентрации, промышленное загрязнение, тяжелые металлы, медь, Среднеуральский медеплавильный завод.

DOI: 10.7868/S0367059713040033

Хотя в эволюционном масштабе времени длительность работы промышленных предприятий пренебрежимо мала, произрастающие в окрестностях металлургических заводов растения могут адаптироваться к избыточному поступлению тяжелых металлов. По сравнению с популяциями из чистых местообитаний в импактных популяциях возрастает как доля устойчивых к металлам особей, так и степень устойчивости отдельных индивидуумов (Ernst, 2006).

Металлоустойчивость растений активно исследуют в разных аспектах – физиологическом, биохимическом, генетическом, экологическом. С середины XX в. для характеристики металлоустойчивости широко используют корневой тест, заключающийся в сравнении скорости линейного роста корня в чистой питательной среде и в среде с добавлением токсиканта (Wilkins, 1957). С его помощью на многих видах (*Agrostis tenuis*, *A. gigantea*, *D. caespitosa*, *Festuca rubra*, *F. ovina*, *Lolium perenne*, *Sedum alfredii*, *Silene paradoxa*, *S. vulgaris* и др.) показана более высокая устойчивость

к разным металлам популяций из загрязненных местообитаний по сравнению с фоновыми (Ernst, 2006).

На раннем этапе использования корневого теста применяли единственную – наиболее показательную – концентрацию металла (Wilkins, 1978), при которой не наблюдается полное угнетение контрольных растений, но в достаточной степени ингибируется рост устойчивых. С развитием экотоксикологии пришло понимание того, что корректная оценка металлоустойчивости возможна лишь при использовании широкого диапазона концентраций металла (Kopittke et al., 2010; Дуля, Микрюков, 2011). В большинстве современных исследований это требование выполняется (Mengen et al., 2003), но математические способы анализа металлоустойчивости растений остаются “архаичными”: чаще всего они сводятся к многочисленным попарным сравнениям скорости роста при разных дозах металла, из-за чего изложение результатов громоздко и сложно для интерпретации. Иногда авторы сравнивают параметры

линейной регрессии, связывающей скорость роста с дозой токсиканта (De Vos et al., 1991; Paschke, Redente, 2002), однако такой подход еще менее обоснован из-за четко выраженной нелинейности зависимости.

Наиболее корректно и информативно характеризовать реакцию на действие токсиканта с помощью аппроксимации дозовой зависимости нелинейными моделями (Ritz, 2010). Согласно представлениям классической токсикологии, зависимость состояния организма от дозы токсиканта в широком диапазоне концентраций описывается сигмоидальной кривой. Для ее характеристики принято использовать эффективные концентрации токсиканта (EC_x), угнетающие рост на 10, 50 и 90% от исходного уровня: EC_{10} и EC_{90} близки к точкам перегиба нелинейной функции, которые маркируют начало и завершение быстрых изменений состояния организма, а EC_{50} делит дозовую кривую пополам и лучше всего оценивает ее положение в диапазоне концентраций. EC_x характеризуют *устойчивость* к токсиканту: чем они выше, тем организм устойчивее. Также принято оценивать угол наклона линейного участка кривой, который показывает, насколько резко ухудшается рост при увеличении дозы токсиканта, и тем самым характеризует *чувствительность* (Weltje, 2003). Дифференцированный анализ чувствительности и устойчивости оказался очень информативным в радиоэкологии (Журавская и др., 1997).

Особенности формы кривой (угол наклона, ширина верхнего или нижнего плато, наличие отклонений от сигмоидальности) обусловлены спецификой влияния токсиканта на организм и механизмами металлоустойчивости (Weltje, 2003; Slikker Jr et al., 2004). Логично предположить, что у адаптированных организмов дозовая зависимость отличается от исходной (положением в диапазоне концентраций и/или формой).

В основе того или иного варианта трансформации лежат разные стратегии приспособления к избытку токсиканта. Поэтому диагностика типа трансформации в сочетании с анализом физиологических и экологических свойств вида позволяет приблизиться к пониманию механизмов адаптации, соответственно прогнозировать последствия загрязнения токсикантами для популяций и экосистем.

Цель данной работы — сравнение трансформации зависимости доза—эффект для двух видов, хорошо адаптированных к загрязнению среды тяжелыми металлами. Для этого в лабораторных условиях с помощью корневого теста в широком диапазоне концентраций Си в питательной среде исследовали реакцию вегетативного потомства материнских растений *Deschampsia caespitosa* и *Lychnis flos-cuculi*. Сами материнские растения

были отобраны с разных территорий — фоновой и длительное время загрязненных выбросами металлургического завода. Такая методическая схема позволила строить дозовые зависимости индивидуально для каждого материнского растения.

Выбор как конкретного токсиканта для экспериментов, так и видов не случаен и продиктован следующим. Хроническое атмосферное загрязнение в течение 70 лет работы металлургического завода привело к тому, что содержание Си вблизи завода на порядки выше, чем на фоновой территории, что можно считать одной из основных причин как элиминации чувствительных видов, так и микроэволюционных преобразований в популяциях устойчивых форм (см. табл. 1). Существующие концентрации Си на импактной территории многократно превышают пороговые значения, определенные для исследуемых видов (Paschke, Redente, 2002).

Выбор видов связан с их способностью выживать и даже увеличивать обилие в условиях загрязнения, в то время как почти все остальные виды полностью исчезают (Cox, Hutchinson, 1980). Согласно нашим данным (Трубина, Дуля, 2007), обилие *D. caespitosa* и *L. flos-cuculi* на исследуемой загрязненной территории в 2–6 раз выше, чем в фоновых условиях (см. табл. 1).

Щучка дернистая *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. (Poaceae) [ITIS № 40586, IPNI № 30074881-2] — многолетний, облигатно микотрофный луговой злак; ацидофильный, выносливый к бедным почвам, гигромезофитный космополитный вид; размножается преимущественно семенным способом. Продолжительность жизни в среднем составляет 40–50 лет, иногда достигая 70–80 лет (Жукова, 1976; Davy, 1980). Горюцвет обыкновенный *Lychnis flos-cuculi* L. [ITIS № 20309, IPNI № 155082-1; = *Silene flos-cuculi* (L.) Clairv., *Coronaria flos-cuculi* (L.) Braun] (Caryophyllaceae) — также космополитный вид, характерный для сырых лугов; способен размножаться половым и вегетативным путем; преимущественно перекрестное опыление осуществляется насекомыми (Biere, 1995). Виды семейств Poaceae и Caryophyllaceae эволюционно далеки друг от друга и отличаются по многим экологическим и физиологическим характеристикам (The Angiosperm ..., 2009). Вместе с тем представители именно этих семейств наиболее устойчивы к промышленному загрязнению (Ernst, 2006; Дуля, Микрюков, 2011). Поэтому представляет интерес их сравнение в аспекте анализа стратегий металлоустойчивости.

Особо следует оговорить использование термина “популяция” в данной работе: им обозначена группировка особей в пределах одной зоны загрязнения, изолированная чередой лесных массивов и удаленная от других аналогичных группировок на 3 км и более. Хотя мы специально

Таблица 1. Характеристика исследуемых местообитаний

Параметр	Зона (расстояние от СУМЗа, км), координаты		
	фоновая (30), 56°48' с.ш., 59°25' в.д.	буферная (4), 56°51' с.ш., 59°49' в.д.	импактная (1), 56°50' с.ш., 59°52' в.д.
Параметры растительности			
Тип сообщества	Луг злаково-разнотравный	Луг разнотравно-злаковый	Луг хвощево-злаковый
Общее проективное покрытие травостоя*, %	91.3 ± 4.75	75.0 ± 7.51	33.4 ± 6.96
Высота травостоя*, см	37.4 ± 4.34	24.8 ± 0.87	23.7 ± 7.95
α-разнообразие*	15.5 ± 3.78	12.6 ± 3.00	2.4 ± 0.50
Обилие <i>D. caespitosa</i> **	1.82 ± 0.09	4.13 ± 0.10	0.56 ± 0.06
Обилие <i>L. flos-cuculi</i> **	2.55 ± 0.18	1.23 ± 0.14	15.90 ± 1.43
Содержание разных форм Си в почве, мкг/г			
Водные	0.52 ± 0.02	1.24 ± 0.39	1.27 ± 0.68
Обменные	0.08 ± 0.02	2.41 ± 1.35	33.31 ± 9.02
Подвижные	22.49 ± 0.40	277.29 ± 107.69	530.93 ± 295.31

Примечание. Приведены средние значения ± стандартное отклонение, $n = 3$, учетная единица – луг; * – по 20–30 площадок размером 0.5×0.5 м на каждом лугу; α-разнообразие – количество видов на одной площадке; ** – плотность особей, шт./м², приведены средние значения ± стандартная ошибка, данные по: Трубина, Дуля, 2007.

не оценивали ранг этих группировок в иерархии популяционных категорий, можно предположить существование некоторой степени пространственной изоляции между ними и, следовательно, охарактеризовать их как микропопуляции.

Для интерпретации результатов необходимо учитывать длительность работы предприятия, исходя из которой можно предположить, что под действием токсического пресса на загрязненной территории в популяциях обоих видов произошел отбор особей с генетически закрепленной повышенной металлоустойчивостью, т.е. в узком смысле адаптированных к избытку Си. Кроме того, для исключения влияния возможной акклимации – индивидуальных обратимых изменений организма под влиянием среды – растения более года выращивали на выровненном экофоне.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемая территория находится в окрестностях Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ, Свердловская обл., г. Ревда). Влияние СУМЗа на биоту многосторонне изучено (Воробейчик и др., 1994; Нестерков, Воробейчик, 2009; Трубина, Воробейчик, 2012). Исследуемые популяции произрастают в луговых сообществах трех зон загрязнения: импактной – 1–1.5 км к западу от завода, буферной – 4 км, фоновой – 30 км. На лугах были проведены геоботанические описания, включающие оценку проективного покрытия и высоты травостоя.

Для анализа содержания Си в почве в каждой зоне отбирали по пять образцов корнеобитаемого слоя (0–10 см) почвы по схеме конверта со стороны 1 м. Воздушно-сухой образец был измельчен и просеян через сито 2 мм. Концентрации водных (в вытяжках деионизированной водой), подвижных (5% HNO₃) и обменных (0.05M CaCl₂ · 6H₂O) форм Си из 2 г почвы в 20 мл экстрагента измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре AAS vario 6 (Analytic Jena, Германия).

Тестируемый материал. В пределах каждой зоны загрязнения материал отбирали на трех лугах, разделенных лесными массивами и удаленных друг от друга на 0.2–1 км. Побеги или семена собирали с материнских растений (по 2–12 на луг), удаленных друг от друга не менее чем на 15 м. Проращивание семян, укоренение побегов с последующим выращиванием вегетативного потомства осуществляли в теплице при естественном освещении в садовой почвосмеси (“TerraVita”, Украина) в условиях выровненного экофона в течение 15 мес. Для токсикологических экспериментов было получено 1228 вегетативных отпрысков от 57 материнских растений *D. caespitosa*, из которых 26 выращены из семян урожая 2006 г., а 31 выкопаны в виде побегов в августе–сентябре 2008 г. Вегетативное потомство *L. flos-cuculi* (378 отпрысков) получено от 28 материнских растений, собранных в августе–сентябре 2007 г.

Оценка металлоустойчивости. Эксперименты проведены по методике корневого теста (в ноябре–декабре 2008 г. – с *L. flos-cuculi* и декабре 2009 г. –

феврале 2010 г. — с *D. caespitosa*). Каждую особь отделяли от материнского растения и помещали в отдельный пластиковый стакан с питательной средой (100 мл среды Хогланда, разбавление 1 : 6, Hoagland's No. 2, Sigma Aldrich, Германия). На предварительном этапе эксперимента растения выращивали в течение 8 дней в чистой питательной среде. После этого параллельно выращивали при разных концентрациях $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в течение пяти дней. Диапазон концентраций (в пересчете на Cu^{2+}) для *D. caespitosa* составил 0.006 (контроль); 0.08; 0.10; 0.13; 0.18, 0.26, 0.31, 0.34, 0.41 и 0.51 мг/л, для *L. flos-cuculi* — 0.006; 0.08; 0.10; 0.13; 0.18, 0.26 мг/л. До и после воздействия Cu у каждой особи измеряли максимальную длину корня и рассчитывали величину его прироста за период экспонирования. Эксперимент проводили при освещении лампами дневного света (16 ч/сут), относительной влажности воздуха 60%, температуре 22°C. В результате эксперимента получено 85 (общее количество семей обоих видов) дозовых зависимостей. Каждое материнское растение было представлено 8–42 особями, из них 2–4 приходились на каждую концентрацию Cu . Таким образом, для каждого материнского растения получен массив данных по его реакции на разные концентрации Cu в питательной среде. В последующий анализ вошли массивы данных для 19 растений *D. caespitosa* из каждой зоны загрязнения, а также для семи растений *L. flos-cuculi* из фоновой, 10 — из буферной и 11 — из импактной зон.

Анализ данных. Разные модели неодинаково описывают одни и те же массивы данных, из-за чего возможно смещение оценок токсикометрических параметров. Наиболее корректно использовать несколько конкурирующих моделей, строго оценивая их соответствие исходным данным, например, с помощью информационного критерия Акаике (*AIC*), который учитывает как точность модели, так и ее простоту (по количеству оцениваемых параметров). Для практического использования абсолютные величины *AIC* трансформируют в значения нормализованного относительного правдоподобия каждой модели (Burnham, Anderson, 2002), или *AIC*-вес, который интерпретируют как вероятность того, что модель лучшая из всего набора исследованных.

Как правило, величины токсикометрических показателей, рассчитанные с помощью разных моделей (даже тех, которые одинаково хорошо согласуются с данными), различаются. Поэтому необходимо снижение неопределенности оценки, связанной с выбором модели, чего можно достигнуть усреднением оценок, полученных с помощью разных моделей. Процедура такого усреднения моделей заключается в расчете средневзвешенного значения токсикометрического параметра по всем

моделям с учетом их *AIC*-весов, а также его стандартной ошибки и доверительного интервала (*ДИ*) (Buckland et al., 1997).

В данной работе зависимость “концентрация Cu —прирост корня” для каждой семьи (т.е. потомства одного материнского растения) аппроксимировали функциями из четырех классов: лог-логистические модели, лог-нормальные, два класса моделей Вейбулла (всего 24 модели; подробнее см.: Ritz, 2010). Нижний предел прироста корня в нелинейных моделях приравнивали нулю. Для каждой модели были рассчитаны *AIC*-веса, кроме того, каждая модель прошла визуальный контроль на соответствие данным. Для оценки *устойчивости* каждой семьи использованы средневзвешенные величины эффективных концентраций EC_{10} , EC_{50} и EC_{90} . Анализ выполнен в ПО R v.2.15.0 (R Development Core Team, 2012) с использованием пакета *drc* v.2.2-1 (Ritz, Streibig, 2005).

Пример последовательности анализа данных представлен на рис. 1. Точки — это значения скорости роста вегетативных отпрысков одной семьи при разных концентрациях Cu в питательной среде, линии — модели, аппроксимирующие зависимость. Процедура усреднения значений эффективных концентраций показана на примере EC_{50} (рис. 1б).

В качестве показателя *чувствительности* использованы значения параметра *b*, характеризующего крутизну линейного участка кривой Вейбулла класса I: чем больше *b*, тем больше крутизна наклона нисходящей кривой и, следовательно, выше чувствительность к токсиканту.

Последующий анализ данных заключался в сравнении EC_x и *b* разных выборок. Отличия считали значимыми, если доверительный интервал для разницы параметров не включал ноль. Для оценки внутривыборочной вариативности этих показателей использовали меру абсолютной изменчивости S_n , представляющую собой среднее расстояние между всеми наблюдениями в выборке по всем сочетаниям. Данный показатель — более робастная и независимая от центра распределения характеристика, чем традиционно используемые стандартное или медианное отклонение (Rousseeuw, Croux, 1993). Все сравнения показателей выполнены с помощью стратифицированного бутстрепа (10000 повторений) с использованием пакета *boot* v.1.3-4 (Canty, Ripley, 2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С приближением к СУМЗу наблюдаются закономерные изменения луговой растительности: падает ее разнообразие, уменьшается высота травянистого яруса, происходит его изреживание, в 1.2–3 раза снижается проективное покрытие в буферной и импактной зонах по сравнению с фоновой

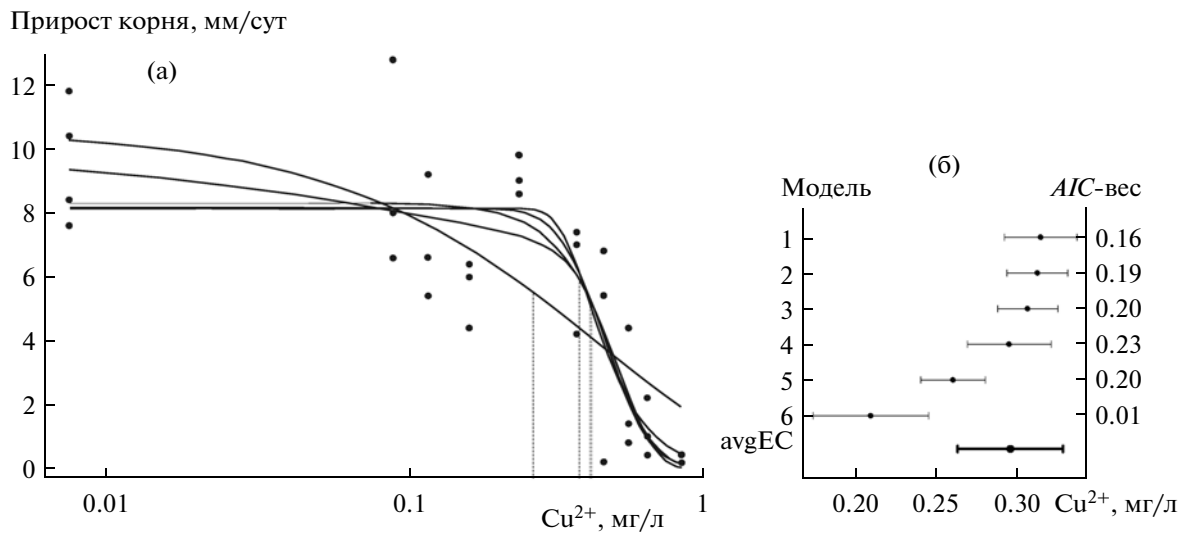


Рис. 1. Пример мультимодельного анализа устойчивости:

а – экспериментальные данные после тестирования растений из семьи № 7 и их аппроксимация моделями; проекции на ось абсцисс – значения EC_{50} ; б – средние значения EC_{50} и их стандартные ошибки, рассчитанные с помощью разных моделей: 1 – Вейбулла I, 2 – лог-нормальной, 3 – Вейбулла II, 4 – Цедергрин-Рица-Штрайбига, 5 – линейной, 6 – экспоненциального затухания; avgEC – средневзвешенное значение EC_{50} .

территорией (табл. 1). Содержание наиболее биодоступной (обменной) формы Cu в почве импактной зоны превышает фоновый уровень в 400 раз, в буферной – в 30 раз (см. табл. 1).

По результатам моделирования дозовых зависимостей в список лучших моделей входят частные случаи модели Цедергрин-Рица-Штрайбига, модель экспоненциального затухания, линейная функция, а также модели Вейбулла с разными формами асимметрии (Ritz, 2010).

Для *L. flos-cuculi* все три эффективные концентрации возрастают в градиенте загрязнения, причем выявлены значимые превышения EC_{50} импактной выборки над EC_{50} буферной и фоновой (в 1.5–2 раза), а также EC_{90} импактной выборки над EC_{90} фоновой (в 3.6 раза). Для *D. caespitosa* в градиенте загрязнения увеличивается только EC_{90} : этот показатель значимо выше (в 1.4 раза) в импактной популяции, чем в фоновой (рис. 2).

Среднее значение b , оценивающего чувствительность, у *D. caespitosa* из импактной зоны ниже, чем из фоновой (рис. 3). В популяциях *L. flos-cuculi* значения b между зонами загрязнения не различаются (см. рис. 3).

Изменчивость всех трех эффективных концентраций для *D. caespitosa* значимо не различается в градиенте загрязнения, тогда как изменчивость EC_x для *L. flos-cuculi* возрастает: S_n EC_{10} и EC_{90} из импактной зоны значимо выше, чем из фоновой и буферной (табл. 2). Изменчивость чувствительности *D. caespitosa* из импактной зоны значимо ниже, чем в фоновой популяции, а у

L. flos-cuculi не меняется в градиенте загрязнения (см. табл. 2).

Для обоих видов частотные распределения токсикометрических показателей, построенные для разных популяций (рис. 4), перекрываются, что свидетельствует о наличии во всех популяциях особей со сходными уровнями устойчивости. Частотные распределения EC_x во всех популяциях *D. caespitosa* правосторонние, что связано с присутствием в них индивидуумов с существенно более высокой устойчивостью по сравнению со средним уровнем в популяции. В то же время для *L. flos-cuculi* такие особи обнаружены только в импактной популяции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если не учитывать феномен гормезиса, то гипотетически при адаптации возможны четыре базовых варианта трансформации зависимости доза–эффект (рис. 5): I – “параллельный перенос” – одинаковое увеличение всех EC_x без изменения чувствительности (рис. 5а); II – снижение чувствительности при увеличении устойчивости только в области максимальных доз (рис. 5б); III – увеличение устойчивости во всем токсическом диапазоне при снижении чувствительности (рис. 5в); IV – возрастание устойчивости в области умеренно неблагоприятных доз с одновременным увеличением чувствительности (рис. 5г).

Трансформация дозовых зависимостей у адаптированных к обитанию на промышленных территориях популяций кардинально различается для

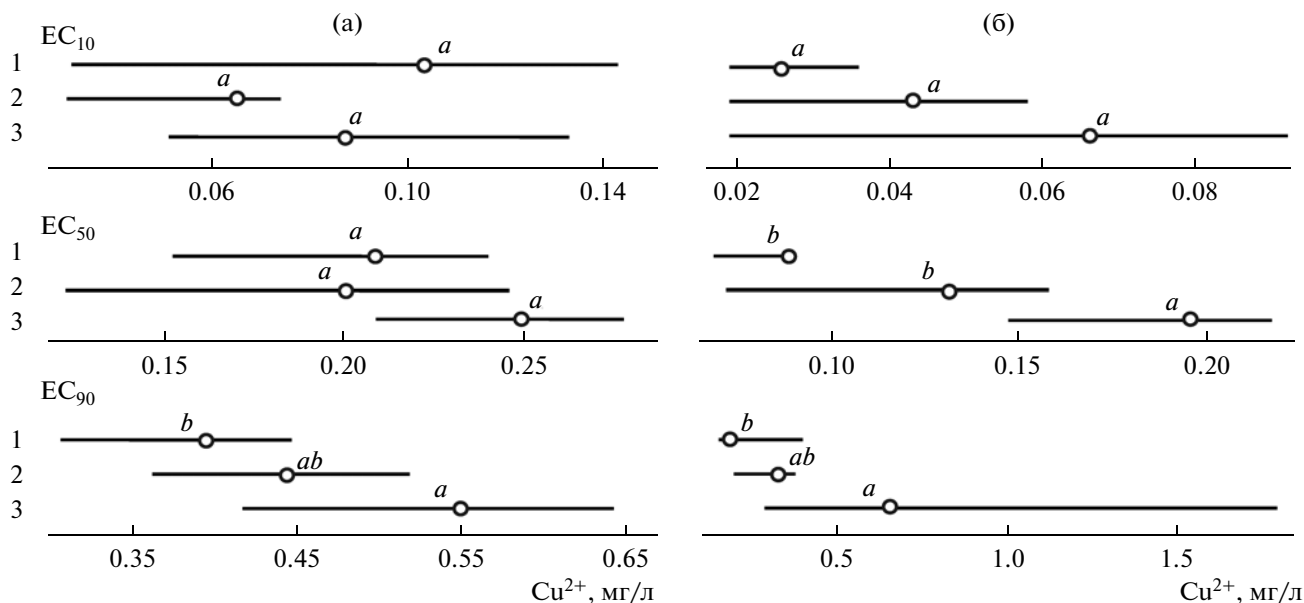


Рис. 2. EC₁₀, EC₅₀, EC₉₀ в популяциях *D. caespitosa* (а) и *L. flos-cuculi* (б) из фоновой (1), буферной (2) и импактной (3) зон загрязнения. Медиана, 95% ДИ (одинаковые буквы обозначают отсутствие отличий между медианами выборок одного вида из разных популяций).

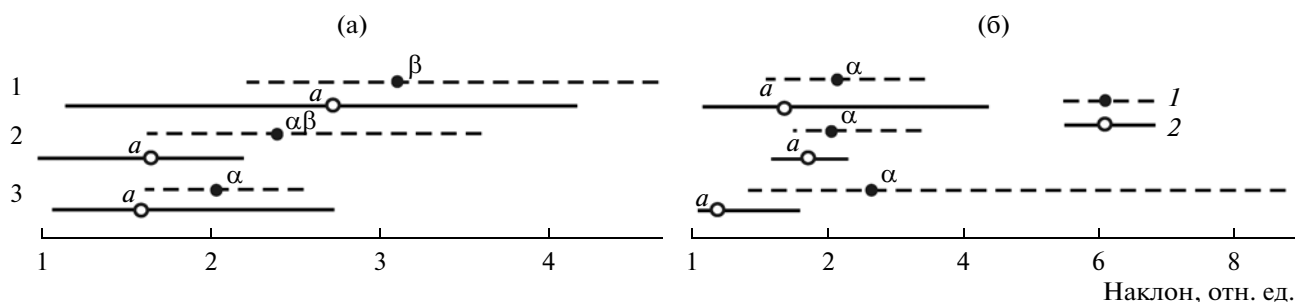


Рис. 3. Наклон в популяциях *D. caespitosa* (а) и *L. flos-cuculi* (б) из фоновой (1), буферной (2) и импактной (3) зон загрязнения. Медиана, 95% ДИ.

1 – значения медиан и 95% ДИ, 2 – средние значения и 95% ДИ. Одинаковые буквы (латинские – для медиан, греческие – для средних значений) обозначают отсутствие отличий между показателями выборок одного вида из разных популяций.

рассмотренных видов. Импактная популяция *D. caespitosa* демонстрирует повышенную устойчивость к концентрациям Cu, находящимся в губительной части токсического диапазона, но не к концентрациям, слабо угнетающим рост. У растений из этой популяции также понижена чувствительность к Cu; следовательно, при загрязнении происходит трансформация зависимости доза–эффект по типу II (см. рис. 5б). В противоположность этому повышенная устойчивость импактной популяции *L. flos-cuculi* по сравнению с фоновой выявлена во всем диапазоне концентраций, причем чувствительность одинакова во всех зонах; следовательно, дозовая зависимость трансформируется по типу I (см. рис. 5а).

Трансформацию зависимостей доза–эффект можно интерпретировать с разных точек зрения.

С позиций физиологии адаптация к избытку Cu у *D. caespitosa* может базироваться на дополнительных механизмах устойчивости, которые включаются только при экстремальных уровнях токсиканта. Примерами таких механизмов могут быть внутриклеточные репарационные процессы (Hall, 2002). Для *L. flos-cuculi* из загрязненных местообитаний характерны механизмы защиты, усиленно (по сравнению с базовым уровнем) работающие во всем диапазоне неблагоприятных концентраций. К ним можно отнести процессы поддержания гомеостаза концентрации Cu в клетке (сниженное поступление ионов, их активный отток из клетки, компартментализация в вакуолях), которые были выявлены у устойчивых к избытку Cu линий родственного вида *Silene vulgaris* (Verkleij et al., 2001). Интересно, что анализ

Таблица 2. Изменчивость показателей устойчивости и чувствительности в популяциях *D. caespitosa* и *L. flos-cuculi* (средние значения S_n , в скобках 95% ДИ, одинаковыми буквами обозначено отсутствие отличий между S_n разных популяций)

Показатель	Зона нагрузки		
	фоновая	буферная	импактная
<i>D. caespitosa</i>			
ЕС ₁₀	0.090 (0.069–0.15) <i>a</i>	0.053 (0.013–0.128) <i>a</i>	0.063 (0.026–0.143) <i>a</i>
ЕС ₅₀	0.084 (0.046–0.133) <i>a</i>	0.093 (0.051–0.146) <i>a</i>	0.063 (0.044–0.136) <i>a</i>
ЕС ₉₀	0.130 (0.044–0.202) <i>a</i>	0.143 (0.063–0.412) <i>a</i>	0.225 (0.115–0.523) <i>a</i>
Наклон	2.412 (1.667–5.168) <i>a</i>	1.412 (0.806–3.249) <i>ab</i>	0.971 (0.547–1.685) <i>b</i>
<i>L. flos-cuculi</i>			
ЕС ₁₀	0.010 (0–0.024) <i>a</i>	0.024 (0.008–0.044) <i>a</i>	0.058 (0.036–0.09) <i>b</i>
ЕС ₅₀	0.029 (0–0.043) <i>a</i>	0.043 (0.014–0.089) <i>a</i>	0.079 (0.029–0.239) <i>a</i>
ЕС ₉₀	0.040 (0.003–0.357) <i>a</i>	0.099 (0.036–0.202) <i>a</i>	0.561 (0.127–1.217) <i>b</i>
Наклон	1.705 (0.013–2.321) <i>a</i>	0.873 (0.352–2.098) <i>a</i>	0.430 (0.075–4.15) <i>a</i>

устойчивости (с помощью последовательного корневого теста в диапазоне концентраций Cu 0.01 – 20 мг/л) популяций этого вида из местообитаний с фоновым, промежуточным и высоким содержанием Cu в почве привел к результатам, сходным с нашими (De Vos et al., 1991): адаптация *S. vulgaris* к Cu сопровождается одинаковым увеличением всех ЕС_x; соответственно этому форма кривой доза–эффект постоянна в градиенте загрязнения (меняется только ее положение в диапазоне концентраций).

С позиций эволюционной генетики чувствительность характеризует уровень фенотипической пластичности: чем она больше, тем ниже пластичность генотипа (Weltje, 2003). При такой интерпретации адаптация *D. caespitosa* реализуется за счет увеличения пластичности механизмов металлоустойчивости, тогда как для *L. flos-cuculi* характерна стратегия адаптации, при которой фенотипическая пластичность остается на прежнем уровне, но увеличивается средний уровень металлоустойчивости. Это подтверждают и косвенные данные: по результатам изучения морфологической изменчивости исследуемых видов в широком спектре экологических условий показано, что *D. caespitosa* – очень пластичный вид (Davy, 1980; Seliskar, 1985), причем уровень физиологической пластичности особей из разных местообитаний может быть различен (Tieszen, Helgager, 1968). В то время как фенотипическая пластичность *L. flos-cuculi* по отношению к множеству факторов низка, и генотипы с разными экологическими оптимумами роста и размножения обладают сходными уровнями пластичности (Biere, 1995).

С позиций экологии трансформацию зависимости у *D. caespitosa* можно интерпретировать следующим образом: в загрязненных местообита-

ниях снижение интенсивности линейного роста корня, вызванное повышенным содержанием Cu в почве, до определенной степени допустимо, поскольку не препятствует успешному существованию растений. Для *L. flos-cuculi*, наоборот, адаптация направлена на избегание любой степени угнетения роста корня. Возможно, эти особенности обусловлены разным строением корневой системы у изучаемых видов. У *D. caespitosa* она состоит из множества придаточных корней длиной 15–30 см, достигающих 60–70 см (Davy, 1980), поэтому губительное влияние Cu , главным образом заключающееся в угнетении апикальной меристемы, может отчасти нивелироваться за счет компенсаторного появления придаточных корней. Корневая система *L. flos-cuculi* представлена коротким (5–8 см) главным корнем и слабо развитыми боковыми (Chaloupecká, Lepš, 2004), поэтому ухудшение роста главного корня может быть критично для величины всасывающей поверхности и соответственно конкурентоспособности особи.

При сравнении дозовых зависимостей *L. flos-cuculi* из фоновой и буферной зон можно было бы ожидать трансформацию по типу IV, поскольку теоретически такой тип трансформации может быть промежуточным вариантом при переходе от фоновой популяции к импактной. Соответствие типу IV свидетельствовало бы о наличии дополнительных механизмов устойчивости у растений из буферной зоны при умеренно неблагоприятных уровнях токсиканта. Главная особенность таких механизмов – низкая “детоксикационная емкость”, как, например, у металлотионеинов, однако роль последних в детоксикации металлов второстепенна (Mengoni et al., 2003). Нами установлено, что форма дозовых кривых сходна в буферной и импактной зонах в популяциях обоих

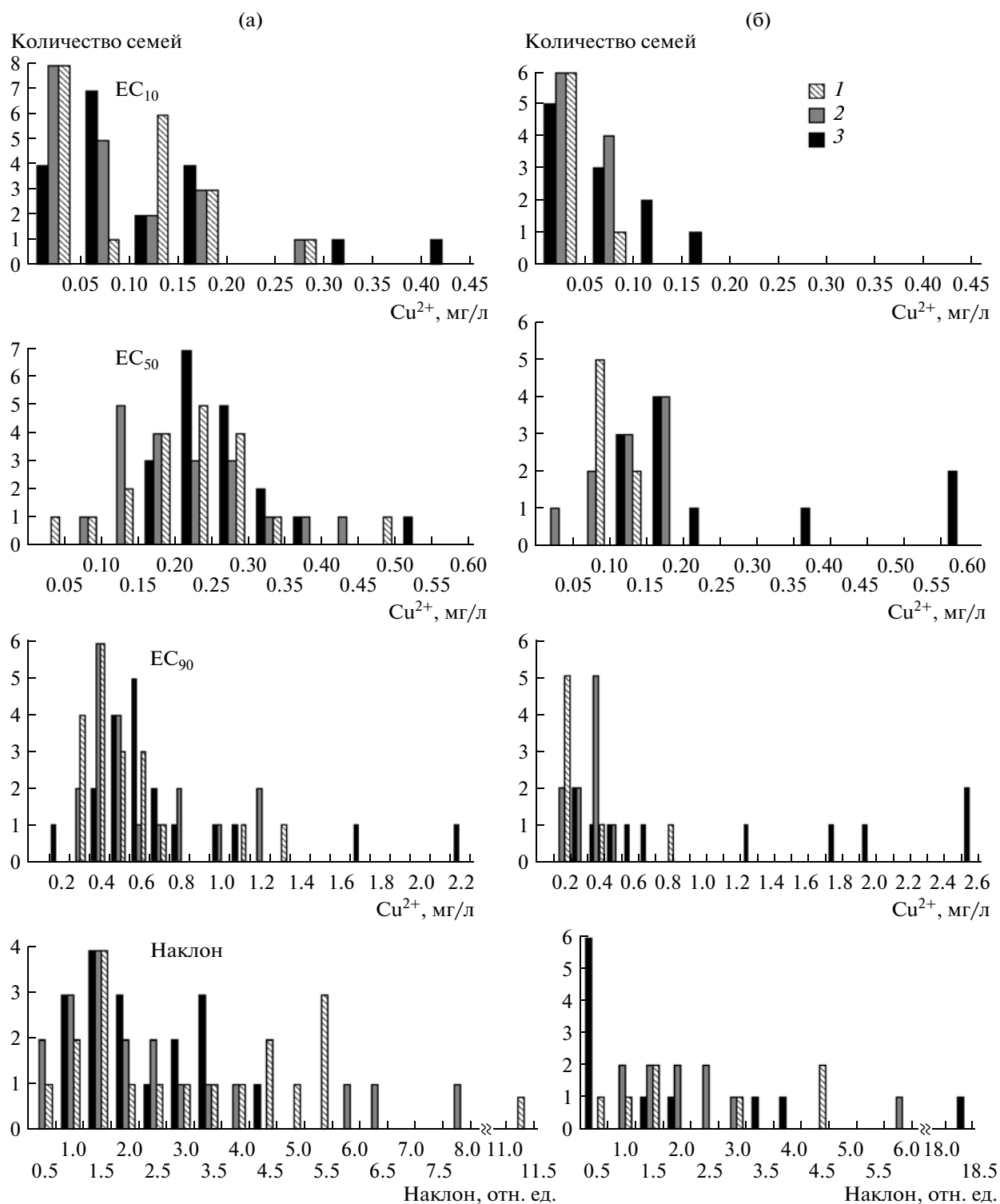


Рис. 4. Частотные распределения EC_{10} , EC_{50} , EC_{90} и наклона дозовой кривой в популяциях *D. caespitosa* (а) и *L. flos-culii* (б) из фоновой (1), буферной (2) и импактной (3) зон загрязнения.

видов; следовательно, вне зависимости от уровня токсиканта в среде, тип трансформации дозовой зависимости — это видовая константа. Это подтверждают и результаты других исследований (De

Vos et al., 1991; Macnair et al., 1993; Mengoni et al., 2003).

Трансформация по типу III, также не выявленная в данной работе, подразумевает индуцирова-

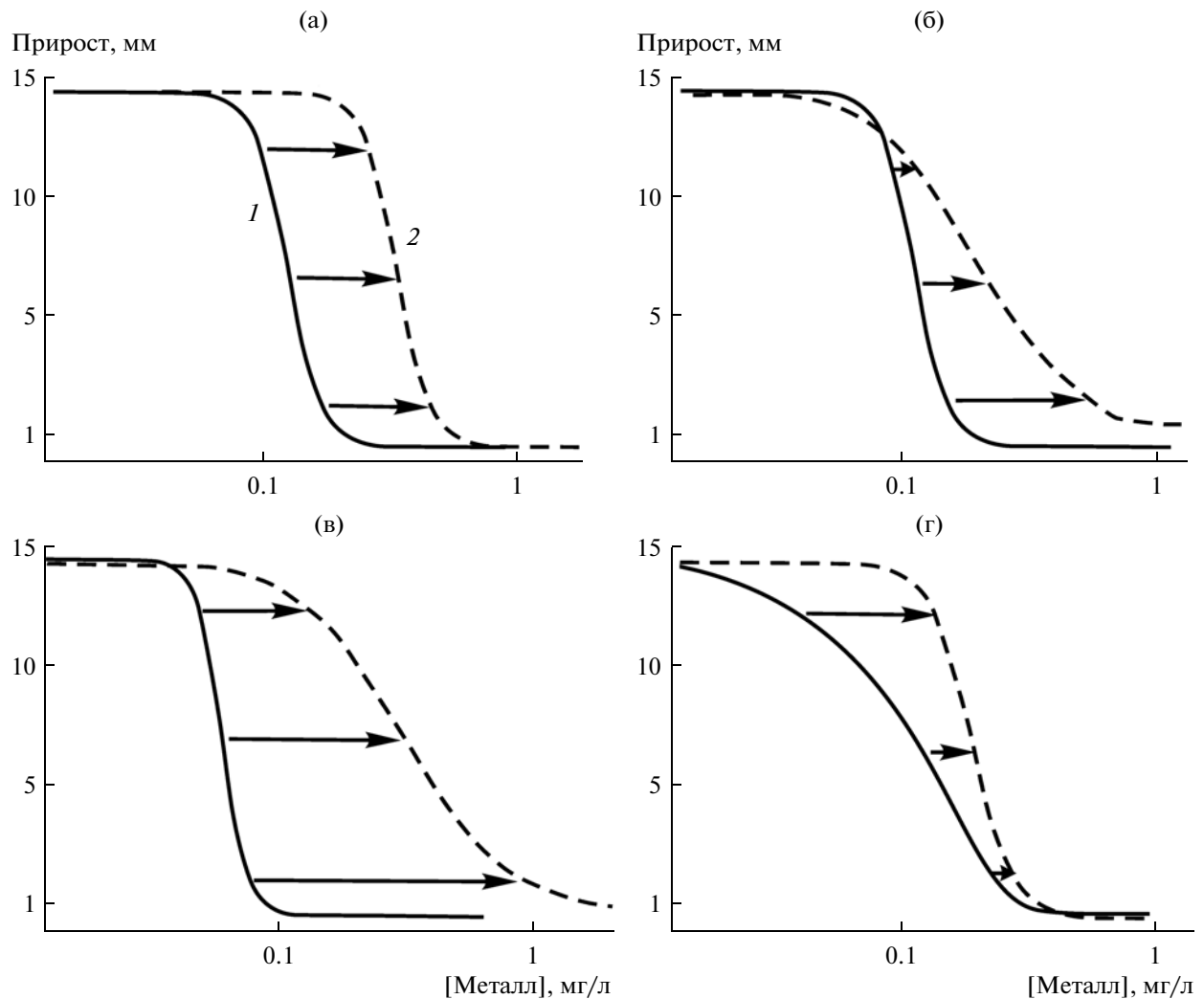


Рис. 5. Гипотетические типы трансформации зависимости доза–эффект при адаптации к избытку тяжелого металла. 1 – дозовая зависимость неустойчивых индивидуумов, 2 – дозовая зависимость адаптированных особей.

ние новых механизмов устойчивости при незначительных уровнях токсиканта, однако в отличие от типов IV и I их эффективность нелинейно возрастает с увеличением концентрации Cu. Такая стратегия адаптации более вероятна у видов, испытывающих сезонные колебания токсичности среды, например у гидрофитов.

Изменчивость показателей металлоустойчивости в фоновой популяции *D. caespitosa* велика и свидетельствует о наличии в ней металлоустойчивых генотипов. Повышенная токсикотолерантность у части особей на фоновой территории (см. рис. 4) может быть обусловлена высоким естественным уровнем пластичности ее физиологических признаков. Сходный феномен был показан для этого вида в отношении температуры (Tieszen, Helgager, 1968). В противоположность этому внутривидовая изменчивость металлоустойчивости *L. flos-cuculi* в фоновой зоне

низка по сравнению с популяциями из загрязненных зон, что подразумевает низкую фенотипическую пластичность в отношении токсического фактора.

В выборках обоих видов из загрязненных местообитаний, помимо металлоустойчивых, обнаружены генотипы с низкими уровнями устойчивости, что и обуславливает высокий уровень изменчивости. Это достаточно неожиданно, так как принято считать, что под действием токсического пресса происходит элиминация неустойчивых генотипов (Meerts, Van Isacker, 1997). Между тем токсичность почвы загрязненных местообитаний определяется не только содержанием тяжелых металлов, но и многими другими параметрами, например pH, содержанием соединений P, органического вещества, и может характеризоваться высокой пространственной гетерогенностью даже в микромасштабе (Воробейчик, Позолотина,

2003). Такая пространственная неоднородность токсичности субстрата на уровне микромасштаба может стать причиной больших различий в металлоустойчивости особей, растущих в непосредственной близости друг от друга (Bradshaw, 1965), и соответственно обусловить высокую изменчивость этого признака в популяции. Также необходимо учитывать, что популяции импактных регионов формируются под действием множества экстремальных условий среды, а не только избытка тяжелых металлов (особый температурный и влажностный режим, недостаток одних питательных элементов и избыток других, нехватка опылителей, ослабление конкуренции и т.д.). По этой причине не совсем корректно характеризовать популяции из загрязненных местообитаний только как металлоустойчивые, хотя это и принято в работах по эволюционной генетике (Ducousso et al., 1990; Mengoni et al., 2001).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ зависимостей доза–эффект для двух видов, совместно произрастающих при разных уровнях промышленного загрязнения, показал, что при адаптации к избытку Cu в среде трансформация дозовой зависимости исследуемых видов различна: для *L. flos-cuculi* характерен “параллельный перенос”, при котором форма кривой не меняется, тогда как у *D. caespitosa* снижается чувствительность к Cu, а устойчивость увеличивается только в области максимальных концентраций. Разные типы трансформации дозовой зависимости свидетельствуют о разных стратегиях адаптации к токсической нагрузке. Таким образом, виды, успешно произрастающие в течение одинакового времени в одних и тех же загрязненных местообитаниях, демонстрируют разные механизмы приспособления к загрязнению.

Поскольку изучаемая территория, помимо Cu, также значительно загрязнена Pb, Zn, Cd и As (Воробейчик и др., 1994), можно предположить наличие устойчивости у растений из исследуемых популяций и к этим элементам. Тем не менее выявленные особенности трансформации зависимости доза–эффект, полученные для Cu, нельзя напрямую экстраполировать на другие элементы, так как немало свидетельств функционирования специфических по отношению к определенным тяжелым металлам механизмов детоксикации (котолерантность). Особенно редки случаи котолерантности к Cu у устойчивых к другим металлам линий. Более подкреплены предположения о множественной устойчивости, т.е. о совместном существовании нескольких металлоспецифичных механизмов защиты (Hall, 2002).

Результаты нашей работы демонстрируют преимущества использования в исследованиях металлоустойчивости растений математического

аппарата, разработанного в классической токсикологии для анализа зависимостей доза–эффект. Этот подход позволяет исключить потерю информации о металлоустойчивости на разных участках диапазона концентраций токсиканта, а также о чувствительности к нему и внутривидовой изменчивости токсикометрических параметров в градиенте загрязнения.

Авторы признательны В.С. Безелю, М.Р. Трубиной и В.Н. Позолотиной за обсуждение работы, Э.Х. Ахуновой – за измерение концентраций Cu. Работа выполнена при поддержке Программы развития ведущих научных школ (проект НШ-5325.2012.4), Президиума УрО РАН (проект 11-4-НП-461) и РФФИ (проект 12-04-32116).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воробейчик Е.Л., Садыков О.Ф., Фарафонов М.Г. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем. Екатеринбург: Наука, 1994. 280 с.
- Воробейчик Е.Л., Позолотина В.Н. Микромасштабное пространственное варьирование фитотоксичности лесной подстилки // Экология. 2003. № 6. С. 420–427. (Vorobeichik E.L. and Pozolotina V.N. Microscale spatial variation in forest litter phytotoxicity // *Russ. J. Ecol.* 2003, vol. 34, no. 6, pp. 381–388).
- Дуля О.В., Микрюков В.С. Влияние методических факторов на результаты экотоксикологических экспериментов: Мета-анализ // Экология: Сквозь время и расстояние. Екатеринбург, 2011. С. 60–68.
- Жукова Л.А. Луговик дернистый (щучка) // Биологическая флора Московской области. М., 1976. Т. 3. С. 62–75.
- Журавская А.Н., Позолотина В.Н., Кершенгольц Б.М. Радиочувствительность семян растений Центральной Якутии // Экология. 1997. № 1. С. 19–23. (Zhuravskaya A.N., Pozolotina V.N., Kershengolts B.M. The radiosensitivity of the seeds of the plants of Central Yakutia // *Russ. J. Ecol.* 1997, vol. 28, no. 1, pp. 15–19).
- Нестерков А.В., Воробейчик Е.Л. Изменение структуры населения беспозвоночных-хортобионтов под действием выбросов медеплавильного завода // Экология. 2009. № 4. С. 303–313. (Nesterkov A.V. and Vorobeichik E.L. Changes in the structure of chortobiont invertebrate community exposed to emissions from a copper smelter // *Russ. J. Ecol.* 2009, vol. 40, no. 4, pp. 286–296).
- Трубина М.Р., Воробейчик Е.Л. Сильное промышленное загрязнение увеличивает β -разнообразие растительных сообществ // ДАН. 2012. Т. 442. № 1. С. 139–141.
- Трубина М.Р., Дуля О.В. Особенности изменения численности локальных популяций и характера размещения особей луговых видов в окрестностях медеплавильного завода // Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель. Екатеринбург, 2007. С. 639–649.
- Biere A. Genotypic and plastic variation in plant size: effects on fecundity and allocation patterns in *Lychnis flos-cuculi* along a gradient of natural soil fertility // *J. Ecology*. 1995. V. 83. № 4. P. 629–642.

- Bradshaw A.D.* Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants // *Adv. Genet.* 1965. V. 13. P. 115–155.
- Buckland S.T., Burnham K.P., Augustin N.H.* Model selection: An integral part of inference // *Biometrics.* 1997. V. 53. № 2. P. 603–618.
- Burnham K.P., Anderson D.R.* Model selection and multi-model inference: A practical information-theoretic approach. New York: Springer, 2002. 488 p.
- Canty A., Ripley B.* boot: Bootstrap R (S-Plus) functions. R package version 1.3-4. 2012. URL: <http://cran.r-project.org/web/packages/boot/index.html>
- Chaloupecká E., Lepš J.* Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa* // *Flora.* 2004. V. 199. № 2. P. 157–167.
- Cox R.M., Hutchinson T.C.* Multiple metal tolerances in the grass *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. from the Sudbury smelting area // *New Phytol.* 1980. V. 84. № 4. P. 631–647.
- Davy A.J.* Biological flora of the British Isles. *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. // *J. Ecology.* 1980. V. 62. № 149. P. 367–378.
- De Vos C.H.R., Schat H., De Waal M.A.M., Vooijs R., Ernst W.H.O.* Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus* // *Physiol. Plant.* 1991. V. 82. № 4. P. 523–528.
- Ducouso A., Petit D., Valero M., Vernet P.* Genetic-variation between and within populations of a perennial grass: *Arrhenatherum elatius* // *Heredity.* 1990. V. 65. P. 179–188.
- Ernst W.H.O.* Evolution of metal tolerance in higher plants // *For. Snow Landsc. Res.* 2006. V. 80. № 3. P. 251–274.
- Hall J.L.* Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exp. Botany.* 2002. V. 53. № 366. P. 1–11.
- Kopittke P.M., Blamey F.P., Asher C.J., Menzies N.W.* Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review // *J. Exp. Botany.* 2010. V. 61. № 4. P. 945–954.
- Macnair M.R., Smith S.E., Cumbes Q.J.* Heritability and distribution of variation in degree of copper tolerance in *Mimulus guttatus* at Copperopolis, California // *Heredity.* 1993. V. 71. № 5. P. 445–455.
- Meerts P., Van Isacker N.* Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe // *Plant Ecology.* 1997. V. 133. № 1. P. 221–231.
- Mengoni A., Barabesi C., Gonnelli C.* et al. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis // *Molec. Ecology.* 2001. V. 10. № 8. P. 1909–1916.
- Mengoni A., Gonnelli C., Hakvoort H.W.J.* et al. Evolution of copper-tolerance and increased expression of a 2b-type metallothionein gene in *Silene paradoxa* L. populations // *Plant Soil.* 2003. V. 257. № 2. P. 451–457.
- Paschke M.W., Redente E.F.* Copper toxicity thresholds for important restoration grass species of the western United States // *Env. Toxicol. Chem.* 2002. V. 21. № 12. P. 2692–2697.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Foundation for Statistical Computing. 2012. URL: <http://www.R-project.org/>
- Ritz C.* Toward a unified approach to dose–response modeling in ecotoxicology // *Env. Toxicol. Chem.* 2010. V. 29. № 1. P. 220–229.
- Ritz C., Streibig J.C.* Bioassay analysis using R // *J. Stat. Softw.* 2005. V. 12. № 5. P. 1–22.
- Rousseeuw P.J., Croux C.* Alternatives to the median absolute deviation // *J. Am. Stat. Assoc.* 1993. V. 88. № 424. P. 1273–1283.
- Seliskar D.M.* Effect of reciprocal transplanting between extremes of plant zones on morphometric plasticity of five plant species in an Oregon salt marsh // *Can. J. Botany.* 1985. V. 63. № 12. P. 2254–2262.
- Slikker Jr. W., Andersen M.E., Bogdanffy M.S.* et al. Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004. V. 201. № 3. P. 203–225.
- The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III // *Bot. J. Linn. Soc.* 2009. V. 161. № 2. P. 105–121.
- Tieszen L.L., Helgager J.A.* Genetic and physiological adaptation in the Hill reaction of *Deschampsia caespitosa* // *Nature.* 1968. V. 219. P. 1066–1067.
- Verkleij J.A., Van Hoof N., Chardonnens A.N.* et al. Mechanisms of heavy metal resistance in *Silene vulgaris* // *Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems* / Eds.: Horst W.J. et al. Kluwer Academic Press, 2001. P. 446–447.
- Weltje L.* Integrating evolutionary genetics and ecotoxicology: on the correspondence between reaction norms and concentration–response curves // *Ecotoxicology.* 2003. V. 12. № 6. P. 532–528.
- Wilkins D.A.* A technique for the measurement of lead tolerance in plants // *Nature.* 1957. V. 180. № 4575. P. 37–38.
- Wilkins D.A.* The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth // *New Phyt.* 1978. V. 80. № 3. P. 623–633.