

УДК 575.17:581.45+504.5:669.2/8

## **ИЗМЕНЕНИЕ ФОРМЫ И РАЗМЕРА ЛИСТЬЕВ *LYCHNIS FLOS-CUCULI* L. В ГРАДИЕНТЕ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

**© О.В. Дуля, В.С. Микрюков**

*Ключевые слова:* *Lychnis*; популяция; генетическая дифференциация; морфология листа; промышленное загрязнение.

Проведен анализ изменчивости генетически закрепленных морфологических параметров листьев *Lychnis flos-cuculi* L. в градиенте влияния промышленных выбросов. Обнаружена как дифференциация близко расположенных популяций (удаленных на 2,5 км друг от друга) в зонах со сравнимыми уровнями загрязнения, так и сходство растений из удаленных на 30 км и контрастных по уровню загрязнения районов. Выявленные особенности морфологии листьев в разных популяциях обсуждаются с позиций экологических условий их местобитаний.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Содержание тяжелых металлов в почве импактных регионов, сформированных в результате действия металлургических предприятий, токсично для большин-

ства живых организмов [1]. Из-за этого растительные сообщества промышленных зон представлены ограниченным набором видов. Как правило, в ходе экотоксикологических экспериментов удается показать, что растения из импактных популяций обладают повышен-

ной металлоустойчивостью по сравнению со своими сородичами из чистых местообитаний [2]. Адаптация к стрессовым уровням химической нагрузки может происходить в течение коротких промежутков времени, вплоть до нескольких поколений [3], поэтому металлоустойчивые популяции стали объектами многосторонних исследований микроэволюционных процессов.

Следует подчеркнуть, что промышленное загрязнение вызывает трансформацию не только химических, но и физических (температурный и влажностный режимы), а также биотических (видовой состав и обилие сообществ, интенсивность конкуренции) параметров среды. Почва загрязненных территорий характеризуется низким содержанием питательных элементов, низкой влагоемкостью [1]. Принято считать, что в этих условиях селективное преимущество имеют особи небольших размеров с пониженной скоростью роста [4]. Однако морфологическая обособленность металлоустойчивых популяций исследована на примере немногих видов [4–5].

Из более 400 семейств цветковых растений представители менее 20 семейств способны заселять территории с высоким содержанием тяжелых металлов техногенного происхождения [2], среди них виды из семейства гвоздичных (*Caryophyllaceae*). На их примере выявлено множество общих физиологических и молекулярно-генетических механизмов металлоустойчивости [6]. Тем не менее, почти не уделено внимания их адаптации к другим стрессовым факторам на антропогенно нарушенных территориях.

Объект данного исследования – горичвет обыкновенный *Lychnis flos-cuculi* L. [= *Silene flos-cuculi* (L.) Clairv., *Coronaria flos-cuculi* (L.) Braun] (*Caryophyllaceae*) – многолетнее розеточное растение, характерное для сырых, мезотрофных лугов. Вид способен размножаться половым и вегетативным путем; преимущественно перекрестное опыление осуществляется насекомыми [7]. В градиенте загрязнения выбросами Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ) обилие *L. flos-cuculi* увеличивается (см. табл. 1). Так как *L. flos-cuculi* – растение с низкой конкурентоспособностью [8], то увеличение его обилия в зоне влияния СУМЗа можно связать с уменьшением конкуренции вследствие изреживания растительности за счет выпадения других видов, чувствительных к загрязнению, а также отбора особей с повышенной токсикотолерантностью. В результате проведенных нами ранее экспериментальных исследований была показана генетически закрепленная повышенная металлоустойчивость растений с загрязненных территорий по сравнению с популяциями фоновых местообитаний [9].

Цель данной работы – оценка генетически закрепленной морфологической дифференциации популяций *L. flos-cuculi* из местообитаний с разным уровнем промышленного загрязнения.

Методическая схема работы подразумевает сравнение морфологических признаков растений разного происхождения, выращенных в одних и тех же условиях, а значит проверку наличия генетической дифференциации между ними [4–5].

Следует оговорить, что термином «популяция» в данной работе обозначена группировка особей в пределах одной зоны загрязнения, изолированная чередой лесных массивов и удаленная от других аналогичных

группировок на 3 км и более. Входящая в популяцию группа особей из одного местообитания (луга), изолированная и удаленная от других таких же групп на 50 м и более, обозначена как «ценопопуляция».

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Исследуемая территория* расположена в окрестностях Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ, Свердловская обл., г. Ревда). Влияние СУМЗа на биоту многосторонне изучено [10]. Исследуемые популяции произрастают в луговых сообществах в четырех зонах загрязнения, расположенных к западу от завода: импактной на расстоянии 1,5 км от СУМЗа, буферной-I – 4 км, буферной-II – 7 км и фоновой – 30 км.

*Сбор растений* в пределах каждой зоны загрязнения проводили в августе – сентябре 2007 г. на двух – трех лугах, разделенных лесными массивами и удаленных друг от друга на 0,2–1 км. Побегов собирали с материнских растений, удаленных друг от друга не менее чем на 15 м. Укоренение побегов с последующим выращиванием вегетативного потомства осуществляли в теплице при естественном освещении в садовой почвосмеси («TerraVita», Украина) в условиях выровненного экофона в течение 27 месяцев. Всего было выращено 82 клона, представленных 1–3 индивидуумами, каждый из которых рос в отдельном горшке. В конце периода был проведен сбор зрелых (окончивших рост) неповрежденных листьев со взрослых индивидуумов (по 3–11 листьев с каждого индивидуума). Всего в анализ вошло 1063 листа. Получение и обработку цифровых изображений листьев проводили с помощью Epson Perfection 2480 Photo и ПО SIAMS Photolab v.4.0.4.x-r4679 (<http://siams.com>). В качестве морфологических параметров листьев использовали площадь, длину (максимальную проекцию) и ширину (проекцию ортогональную максимальной), а также округлость листа (круглый фактор формы – это отношение периметра эквивалентного по площади круга к периметру листа). Использование других подходов, в частности методов геометрической морфометрии, в данном случае затруднено – невыраженное жилкование, а также отсутствие границы между черешком и листовой пластинкой не позволяют расставить метки.

*Для анализа токсической нагрузки* на каждом лугу отбирали по пять образцов корнеобитаемого (0–10 см) слоя почвы по схеме конверта со стороной 1 м. Воздушно-сухой образец измельчали и просеивали через сито 2 мм. Концентрации обменной формы Cu, Cd, Pb и Zn из 2 г почвы в 20 мл 0,05 М CaCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре AAS vario 6 (Analytic Jena, Германия). В качестве интегрального показателя токсичности использовали индекс токсической нагрузки ( $I_{\text{токс}}$ ), рассчитанный как среднее по всем четырем элементам значение отношений каждого элемента в пробе к его минимальному содержанию на фоновой территории. На исследуемых лугах проведены геоботанические описания с оценкой видового состава, проективного покрытия и высоты травостоя.

*Математическая обработка данных* выполнена в ПО R v.2.15.1. Значимость различий между популяциями разных зон загрязнения, а также ценопопуляциями в пределах каждой зоны загрязнения по форме и

размеру листьев оценена в пакете *vegan* v.2.1-20 [11] с помощью непараметрического многомерного однофакторного дисперсионного анализа матрицы морфологических расстояний [12] (использована Евклидова метрика, переменные стандартизованы по размаху). Проверку нулевой гипотезы (отсутствие отличий между группами) осуществляли с помощью перестановочного теста (10 000 перестановок). Для визуализации многомерных данных использован метод главных компонент (PCA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно значениям  $I_{\text{токс}}$ , токсичность почвы в импактной зоне выше, чем в фоновой в 55 раз, в буфер-

ной-I – в 7, в буферной-II – в 4 раза (табл. 1). Высота, проективное покрытие и видовое разнообразие травостоя минимальны в импактной зоне. Наибольшая высота и проективное покрытие травостоя отмечены на лугах в буферной-II зоне (табл. 1).

По результатам однофакторного анализа выявлено значимое влияние зоны загрязнения на размер и форму листьев ( $MS = 0,46$ ;  $F(3; 82) = 18,15$ ;  $p = 0,0001$ ). Согласно результатам множественных сравнений, отличия между всеми зонами загрязнения были значимы ( $F > 10,83$ ;  $p \leq 0,0006$ ), исключение составили популяции фоновой и буферной-I зон – форма и размер листьев их представителей были сходны ( $F = 1,46$ ;  $p = 0,23$ ).

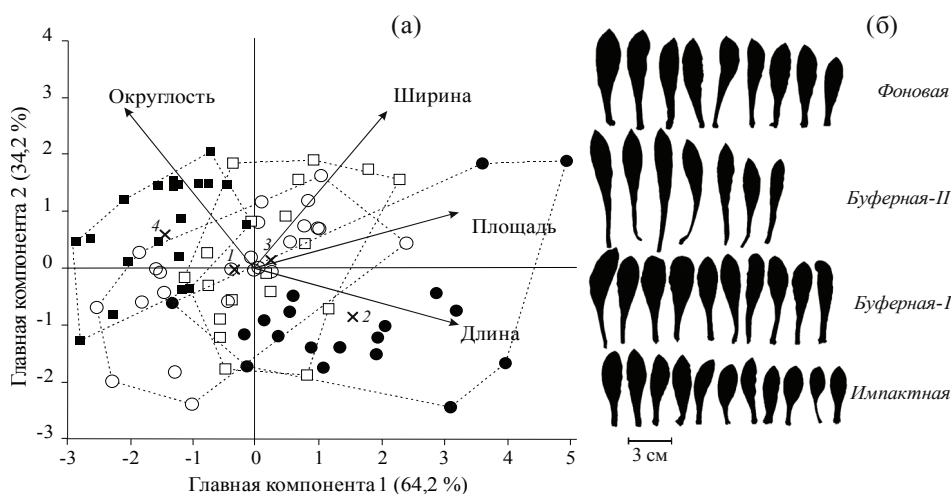
По результатам анализа главных компонент наибольшие межгрупповые расстояния отмечены между

Таблица 1

Параметры травостоя и токсичность почвы в исследуемых местообитаниях *L.flos-cuculi*

Зона загрязнения, координаты	Луг	$I_{\text{токс}}$	Высота травостоя, см	ОПП травостоя	Обилие <i>L.flos-cuculi</i>
Фоновая 56°48'С 59°25'В	1*	4,9 ± 3,40	37,1 ± 3,3	95,5 ± 0,3	2,55 ± 0,18
	2*	8,4 ± 3,25	41,9 ± 0,3	92,2 ± 2,9	
	3	6,4 ± 1,95	33,2 ± 7,3	86,1 ± 6,8	
	Avg	6,6 ± 1,76	37,4 ± 4,34	91,3 ± 4,75	
Буферная-II 56°51'С 59°46'В	1	69,5 ± 21,08	40,6 ± 7,8	95,3 ± 1,9	3,18 ± 0,25
	2	48,4 ± 5,85	64,6 ± 0,8	88,8 ± 15,3	
	Avg	59,0 ± 13,46	52,6 ± 17,0	92,05 ± 4,6	
Буферная-I 56°51'С 59°49'В	1	40,6 ± 10,78	24,1 ± 10,2	75,8 ± 13,9	1,23 ± 0,14
	2	125,8 ± 32,88	24,6 ± 3,0	67,2 ± 10,3	
	3	97,0 ± 34,28	25,8 ± 4,5	82,1 ± 7,0	
	Avg	87,8 ± 43,78	24,8 ± 0,87	75,0 ± 7,51	
Импактная 56°50'С 59°52'В	1	330,4 ± 87,175	17,5 ± 6,4	29,8 ± 16,4	15,9 ± 1,43
	2	433,8 ± 75,475	32,7 ± 4,2	41,4 ± 19,6	
	3	334,4 ± 140,6	20,9 ± 2,9	28,9 ± 6,8	
	Avg	366,2 ± 58,56	23,7 ± 7,95	33,4 ± 6,96	

*Примечание:* приведены средние значения ± стандартное отклонение; Avg – среднее для зоны загрязнения; для  $I_{\text{токс}}$   $n = 5$  почвенным образцам; для параметров травостоя,  $n = 3$  учетным площадям 25×25 м, в пределах которых заложено по 10 геоботанических площадочек 0,5×0,5 м; \*  $n = 2$ ; ОПП – общее проективное покрытие, %; обилие *L.flos-cuculi* – количество особей на 1 м<sup>2</sup> (данные взяты из [7]).



**Рис. 1.** Результаты анализа формы и размера листьев *L.flos-cuculi* из разных зон загрязнения (фоновой ○, буферной-II ●, буферной-I □, импактной ■) с помощью метода главных компонент (а), крестиками указаны центры популяций (фоновой – 1, буферной-II – 2, буферной-I – 3, импактной – 4). Типичные листья в разных популяциях (б). Показаны листья особей, наиболее близких к центрам популяций

Таблица 2

Параметры листьев и их изменчивость в популяциях *L. flos-cuculi* из зон с разными уровнями загрязнения, учетная единица – материнское растение

Зона загрязнения	Луг	N	Площадь, см <sup>2</sup>		Длина, см		Ширина, см		Округлость	
			<i>m</i> ± SE	CV	<i>m</i> ± SE	CV	<i>m</i> ± SE	CV	<i>m</i> ± SE	CV
Фоновая	1	6	6,4 ± 0,85	33	6,8 ± 0,52	19	1,60 ± 0,12	19	0,57 ± 0,01	4
	2	9	5,4 ± 0,50	28	6,5 ± 0,27	12	1,43 ± 0,08	17	0,55 ± 0,02	8
	3	9	5,3 ± 0,77	44	6,5 ± 0,53	24	1,37 ± 0,10	22	0,55 ± 0,01	8
	Avg	24	5,6 ± 0,40	35	6,5 ± 0,25	19	1,45 ± 0,06	20	0,56 ± 0,01	7
Буферная-II	1	12	7,3 ± 0,73	34	9,2 ± 0,56	21	1,42 ± 0,08	20	0,47 ± 0,01	10
	2	7	8,3 ± 1,00	31	10,1 ± 0,79	20	1,59 ± 0,12	20	0,46 ± 0,02	11
	Avg	19	7,7 ± 0,58	33	9,5 ± 0,46	20	1,49 ± 0,07	20	0,47 ± 0,01	10
Буферная-I	1	6	5,7 ± 0,41	18	7,2 ± 0,57	19	1,44 ± 0,09	15	0,53 ± 0,03	14
	2	6	7,1 ± 0,74	25	7,2 ± 0,23	8	1,71 ± 0,12	18	0,57 ± 0,02	9
	3	7	6,0 ± 0,75	33	7,0 ± 0,37	14	1,53 ± 0,09	15	0,54 ± 0,01	4
	Avg	19	6,2 ± 0,39	27	7,1 ± 0,23	13	1,56 ± 0,06	17	0,55 ± 0,01	10
Импактная	1	4	4,4 ± 0,70	31	5,1 ± 0,31	11	1,35 ± 0,16	24	0,61 ± 0,02	6
	2	6	5,4 ± 0,45	20	5,5 ± 0,28	12	1,60 ± 0,07	10	0,64 ± 0,01	5
	3	10	3,9 ± 0,26	21	4,8 ± 0,22	14	1,39 ± 0,06	13	0,63 ± 0,02	8
	Avg	20	4,5 ± 0,26	26	5,1 ± 0,16	19	1,44 ± 0,05	15	0,63 ± 0,01	7

буферной-II и импактной (0,41), а также буферной-II и фоновой зонами (0,31) (рис. 1). Минимальное расстояние выявлено между фоновой и буферной-I популяциями, они не превышали внутригрупповые (от 0,15 в импактной популяции до 0,24 в буферной-II).

В целом растения из импактной зоны характеризовались наименьшими размерами и наибольшей округлостью листьев (табл. 2; рис. 1). Максимальный размер листьев характерен для представителей буферной-II зоны. Значимых различий по форме и размерам листьев между ценопопуляциями в пределах каждой зоны загрязнения не выявлено ( $F < 1,17$ ;  $p > 0,16$ ). Относительная внутрипопуляционная изменчивость каждого параметра (CV) в разных зонах загрязнения, а также в пределах каждой ценопопуляции сходна (табл. 2).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе выявлены генетически закрепленные различия по размеру и форме листьев между популяциями *L. flos-cuculi* из зон с разными уровнями влияния промышленных выбросов. Для растений из популяции максимально загрязненной зоны характерна небольшая листовая пластинка компактной формы. Наиболее длинные листья с большой площадью характерны для популяции из середины градиента загрязнения (буферной-II зоны).

В работах, посвященных изучению морфологических и фенологических показателей *Silene maritima*, *Mimulus guttatus*, *Thlaspi caerulescens*, как правило, растения загрязненных зон характеризуются небольшими размерами по сравнению с фоновыми представителями [4–5]. Причины этого видят в низком содержании питательных элементов в почве загрязненных зон, техногенной «аридизации» условий, а также сниженной скорости метаболизма, связанной с повышенной токсикотолерантностью [13].

На основе имеющейся информации мы можем предполагать следующие причины существования выявленной дифференциации популяций *L. flos-cuculi* в

пределах рассматриваемой территории. В импактной зоне изреженность травостоя максимальна, и, соответственно, увеличена инсоляция нижнего яруса и поверхности почвы. Согласно анализу суточного хода температуры, на исследуемых лугах в течение вегетационного периода среднесуточная максимальная температура, а также амплитуда суточных колебаний у поверхности почвы в импактной зоне превосходит фоновые значения на 1,4; 6,92 и 8,6 °C соответственно [14]. В условиях интенсивной инсоляции растению наиболее «выгодны» небольшие листья, формирующие компактную розетку [8], что и наблюдается в импактной зоне. Также может быть справедлива гипотеза о значимой роли пониженного содержания питательных элементов в почве, т. к. в градиенте загрязнения происходит снижение содержания легкогидролизуемого азота и обменного калия в почве (данные не представлены), а также содержания обменного кальция и магния [10].

В буферной-II зоне растения произрастают в увлажненных местообитаниях (пойма р. Листвянки) с наиболее густым и высоким травостоем (табл. 1). Соответственно нижние ярусы травостоя на этих участках чрезвычайно затенены. У розеточных видов в условиях затенения селективное преимущество имеют особи с длинными вертикально ориентированными листьями с большой площадью фотосинтезирующей поверхности [8]. Сходство формы и размера листьев фоновой и буферной-I территорий могут свидетельствовать о сходных факторах отбора по исследуемым признакам.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведен анализ генетически закрепленных морфологических параметров листьев *L. flos-cuculi* из популяций, произрастающих в градиенте влияния выбросов медеплавильного завода. Выявлена как дифференциация близко расположенных популяций (удаленных на 2,5 км друг от друга) со сравнимыми уровнями загрязнения, так и сходство растений из

удаленных почти на 30 км и очень контрастных по уровню загрязнения районов.

Для максимально полного раскрытия экологической обусловленности дифференциации популяций *L. flos-cuculi* по морфометрическим показателям листьев необходимы специальные исследования экологических условий на изучаемой территории в сочетании с экспериментами по оценке влияния разных факторов в контролируемых условиях или при помощи перекрестной трансплантации растений *in situ*. На основе имеющейся информации можно сделать вывод, что влияние загрязнения на генетическую структуру популяций по форме и размерам листа, скорее всего, не прямое, а опосредованное через изменение абиотических и биотических параметров среды.

Также остается открытым вопрос об эволюционно-генетических механизмах выявленной морфологической дифференциации *L. flos-cuculi*. На наш взгляд, возможны два сценария ее происхождения. Согласно первому из них, между популяциями разных зон сохраняется интенсивный поток генов, но его роль низка по сравнению с давлением отбора на исследуемых территориях. В качестве примера, подтверждающего справедливость этой гипотезы, может служить исследование *T. caerulea* [5].

Согласно второму сценарию, выявленные различия – это в большей степени следствие изоляции популяций или различий между родительскими популяциями, которые были дифференцированы задолго до начала работы предприятия. Независимое происхождение, а также увеличение репродуктивной изоляции популяций близко расположенных местообитаний хорошо документированы [15]. Для проверки изложенных гипотез необходима реконструкция истории исследуемых популяций, а также анализ интенсивности потока генов между ними, например, с помощью селективно нейтральных генетических маркеров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bell J.N.B., Treshow M. Air pollution and plant life. 2nd Ed. N. Y., 2002. P. 465.
2. Дуля О.В., Микрюков В.С. Влияние методических факторов на результаты экотоксикологических экспериментов: мета-анализ // Экология: Сквозь время и расстояние: материалы Всерос. конф. молодых ученых. Екатеринбург, 2011. С. 60-68.
3. Wu L., Bradshaw A.D., Thurman D.A. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis stolonifera* // Heredity. 1975. V. 34. № 2. P. 165-187.
4. Baker A.J.M., Dalby D.H. Morphological variation between some isolated populations of *Silene maritima* with in the British-Isles with particular reference to inland populations on metalliferous soils // New Phytologist. 1980. V. 84. № 1. P. 123-138.
5. Jimenez-Ambriz G., Petit C., Bourrie L., Dubois S., Olivieri I., Ronce O. Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France: role of gene flow, selection and phenotypic plasticity // New Phytologist. 2007. V. 173. № 1. P. 199-215.
6. Hassinen V.H., Tervahauta A.I., Schat H., Karenlampi S.O. Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? // Plant Biology. 2011. V. 13. № 2. P. 225-232.
7. 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: материалы конф. Екатеринбург, 2007. С. 639-649.
8. Chaloupecká E., Lepšcaron 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.
9. Дуля О.В. Металлоустойчивость популяций *Lychnis flos-cuculi* из зон с разными уровнями промышленного загрязнения // Биологические системы – устойчивость, принципы и механизмы функционирования: материалы конф. Н. Тагил, 2010. С. 175-179.
10. Воробейчик Е.Л., Садыков О.Ф., Фарафонов М.Г. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем. Екатеринбург, 1994. С. 280.
11. Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Wagner H. vegan: Community Ecology Package. R package, 2012. URL: <http://R-forge.R-project.org/projects/vegan/> (дата обращения: 26.09.2012).
12. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance // Austral Ecology. 2001. V. 26. № 1. P. 32-46.
13. Трубина М.Р. Стратегия выживания *Strepis tectorum* L. в условиях хронического атмосферного загрязнения // Экология. 2011. № 2. С. 1-8.
14. Нестерков А.В., Воробейчик Е.Л. Влияние промышленного загрязнения на суточную динамику обилия беспозвоночных-хортобионтов // Естественные науки. 2010. № 3. С. 96-102.
15. Vekemans X., Lefebvre C. On the evolution of heavy-metal tolerant populations in *Armeria maritima*: Evidence from allozyme variation and reproductive barriers // Journal of Evolutionary Biology. 1997. V. 10. № 2. P. 175-191.

БЛАГОДАРНОСТИ: Авторы благодарны д. б. н. Е.Л. Воробейчику за помощь при обсуждении работы, а также Э.Х. Ахуновой за химический анализ почвы.

Работа выполнена при поддержке Президиума УрО РАН (проект 11-4-НП-461), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-32116) и Программы развития ведущих научных школ (проект НШ-5325.2012.4).

Поступила в редакцию 29 сентября 2012 г.

#### Dulya O.V., Mikryukov V.S. FORM AND SIZE CHANGE OF *LYCHNIS FLOS-CUCULI* L. LEAFS IN GRADIENT OF HEAVY METAL POLLUTION

We analyzed the variability of inherited leaf parameters of *Lychnis flos-cuculi* L. in the gradient of industrial emissions. Genetic differentiation was revealed between close populations (at distance of 2.5 km from each other) growing under similar levels of pollution and the lack of differentiation was observed between regions with contrasting pollution levels and situated 30 km apart. The specificity of leaves in the populations in terms of ecological conditions of their habitats is discussed.

**Key words:** *Lychnis*; population; genetic differentiation; leaf morphology; industrial pollution.