

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ У СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА *PLANTAGO MAJOR* L. В ЗОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ПРОИЗВОДСТВА

© 2017 г. Н. С. Шималина, В. Н. Позолотина, Н. А. Орехова, Е. В. Антонова

Институт экологии растений и животных УрО РАН, 620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

e-mail: pozolotina@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 02.02.2017 г.

Изучено качество семенного потомства подорожника большого из популяций, длительное время произрастающих в градиенте химического загрязнения в зоне воздействия Карабашского медеплавильного завода (КМЗ). Установлено, что диапазон изменчивости всхожести семян и выживаемости проростков в фоновых популяциях был шире, чем в импактных. Для выборки из наиболее загрязненного участка характерны наименьшие величины ростовых характеристик (число проростков с настоящим листом и длина корней). Провокационное воздействие токсических элементов (прорастивание на почвах с загрязненных участков) привело к стимуляции разной интенсивности скорости формирования листьев у проростков и подавлению роста корней. По этим данным невозможно утверждать, что адаптивный потенциал растений, сформировавшихся в зоне воздействия КМЗ, изменен по сравнению с остальными выборками. Оценка про- и антиоксидантного статуса проростков в зоне влияния КМЗ показала снижение по сравнению с фоновыми выборками активности супероксиддисмутазы (60% от фоновых), каталазы (33%) и повышение активности пероксидазы (122%). Обнаружено повышенное прооксидантное состояние у проростков из зоны влияния КМЗ, за исключением выборки с наиболее загрязненного участка.

Ключевые слова: Карабашский медеплавильный завод, ценопопуляции, *Plantago major* L., семенное потомство, меж- и внутривидовая изменчивость жизнеспособности, металлоустойчивость, биохимический статус.

DOI: 10.7868/S0367059717060038

Важным условием стабильного существования популяций как в пространстве, так и во времени является полноценное репродуктивное воспроизводство. Этот процесс у всех живых организмов наиболее чувствителен [1, 2]. Изучение жизнеспособности семенного потомства растений считается одним из путей оценки состояния биосистем в зонах воздействия промышленных предприятий. Фундаментальная задача таких исследований связана с выявлением многообразия механизмов адаптации живых организмов к техногенному стрессу, которые обеспечивают функционирование основных процессов жизнедеятельности организмов на достаточном уровне и позволяют им развиваться. Проведенные ранее исследования свидетельствуют о том, что при загрязнении окружающей среды у растений возможны подавляющие эффекты, а также индифферентные [1, 3–6] и даже стимулирующие [7, 8].

Причины, порождающие противоречивые заключения, разнообразны. Механизмы металлоустойчивости принято относить к двум разным стратегиям выживания организмов в условиях

техногенного стресса: 1) ограничение поступления токсикантов в клетки; 2) действие внутриклеточных механизмов их детоксикации и восстановление нарушенных структур [3, 9, 10]. Важную роль в металлоустойчивости играют антиоксидантные системы растений [9, 11, 12]. У разных видов арсенал защитных и восстановительных механизмов различается [5, 9, 13]. Результирующий эффект зависит также от сопутствующих факторов окружающей среды: как абиогенных (особенности почв, климата, погодных условий разных регионов), так и биогенных (внутривидовая изменчивость, экосистемные связи) [5, 14]. Можно предполагать, что каждая популяция, испытывающая пролонгированное воздействие токсикантов, проходит многие этапы отбора и приобретает специфические черты [15].

Цель настоящей работы – сравнительная оценка жизнеспособности, металлоустойчивости и биохимического статуса семенного потомства подорожника большого из популяций, произрастающих длительное время в зоне влияния Карабашского медеплавильного завода (КМЗ) и на фоновых территориях.

Проверяемые гипотезы: 1) жизнеспособность семенного потомства подорожника, вариабельность ростовых показателей и биохимический статус проростков фоновых выборок отличаются от импактных, сформировавшихся в зоне влияния Карабашского медеплавильного завода; 2) возможен феномен преадаптации в выборках, длительное время испытывающих техногенный стресс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – подорожник большой (*Plantago major* L.) – многолетнее травянистое поликарпическое растение из семейства Plantaginaceae Juss. Вид диплоидный, $2n = 12$, размножается преимущественно семенами [16]. Выбор данного вида обусловлен его повсеместной встречаемостью и высокой семенной продуктивностью.

Исследования проводили в зоне воздействия Карабашского медеплавильного завода (КМЗ), который начал работу в 1910 г. при полном отсутствии оборудования по очистке пылегазовых выбросов и сточных вод. В 60-е и 70-е годы XX в. выбросы загрязняющих веществ в атмосферу были максимальны. Основную часть выбросов составляли сернистый ангидрид – до 365 тыс. т в год и пыль с сорбированными в ней тяжелыми металлами (ТМ) – до 31 тыс. т [17]. Деятельность КМЗ была приостановлена с 1989 по 1997 г. В процессе реконструкции и после нее выбросы существенно снизились, например в 1994 г. они составили около

0,8 тыс. т [18]. Однако запас поллютантов (Zn, Cu, Pb, Cd), накопленный в почвах, остается до сих пор очень большим, превышая фоновый уровень на 1–2 порядка величин, повышена и кислотность почв в импактной зоне ($pH_{\text{водный}} \approx 5,8$ при фоновом значении $\approx 6,4$) [19].

Исследованная территория входит в подзону Южно-Зауральской провинции. Преобладают сосново-березовые разнотравные леса [17]. Почвенный покров представлен дерново-подбурами, буроземами, дерново-подзолистыми, серыми и темно-серыми почвами. В регионе преобладает тип почв Cambic Podzol (согласно классификации WRB). На наиболее близких к комбинату участках почвы химически преобразованы, вплоть до техногенных образований, лишенных растительности [20].

С учетом розы ветров в зоне влияния КМЗ были выбраны четыре площадки в северо-восточном направлении (рис. 1). Расстояние от предприятия введено в маркировку участков: КМЗ-1 – участок в пределах г. Карабаша (на расстоянии 0,5–1,5 км от предприятия); КМЗ-5 – окрестности пос. Старомедный; КМЗ-8 – поворот на р. Аткус; КМЗ-10 – поворот на оз. Агардыш. Фоновые площадки, не подверженные загрязнению, находились на расстоянии 32 и 24 км от завода: поворот на Сугомакскую пещеру (Фон-1) и поворот к пионерскому лагерю им. Ю.А. Гагарина (Фон-2). Дополнительно использовали фоновые площадки, расположенные в Средне-Зауральской провинции:

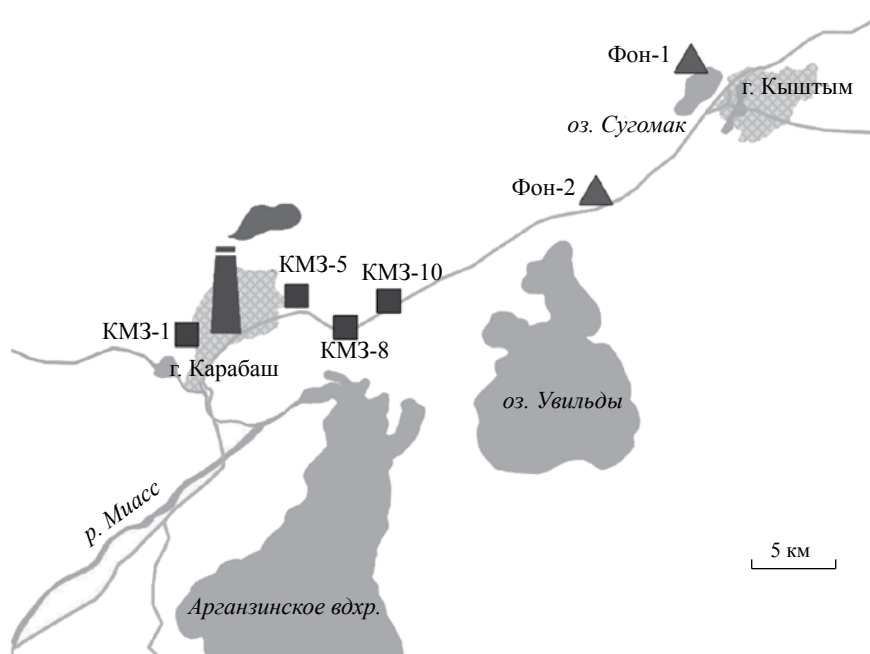


Рис. 1. Карта-схема района исследования.

Фон-3 – пос. Шеелит (162 км от КМЗ); Фон-4 – биостанция УрФУ (137 км от КМЗ).

Места отбора проб были приурочены к обочинам редко используемых проселочных дорог и просекам, где произрастают лугово-рудеральные и разнотравно-злаковые сообщества, в которых *Plantago major* относится к субдоминантным видам. Семена подорожника собирали на участках вдоль 2–3 трансект протяженностью от 0.5 до 1 км с 10 индивидуальных растений, а также смесь семян с 40–50 растений в каждой ценопопуляции, расстояние между растениями было не менее 15 м. На площадке КМЗ–1 в г. Карабаше трансекта была проложена вдоль выселенной улицы Освобождение Урала, включая дворы заброшенных домов. Травянистый покров здесь был сильно разреженный, растения подорожника встречались на больших расстояниях друг от друга.

Содержание подвижных форм тяжелых металлов (Cu, Cd, Pb, Zn) в почвах (верхний 0–10-см слой) определяли на спектрофотометре ААС-3 фирмы “Carl Zeiss” по стандартизированной методике; металлы экстрагированы из субстрата 0.5%-ным раствором HNO_3 .

Жизнеспособность семян подорожника оценивали, проращивая их методом рулонной культуры на дистиллированной воде в течение 21 сут при $+24^\circ\text{C}$ и 12-часовом световом режиме. Критерии оценки: всхожесть семян, выживаемость проростков, доля проростков с настоящими листьями, длина корня. В опыте I проращивали смесь семян из каждой ценопопуляции в 4 повторностях. В опыте II оценивали внутривоупуляционную изменчивость качества семян, проращивая семена с 10 индивидуальных растений из каждой выборки. В опыте III выявляли адаптивный потенциал семенного потомства из разных ценопопуляций, используя метод провокационного воздействия ТМ. Смесь семян из каждой ценопопуляции проращивали в сосудах со взвесью почвы с загрязненных участков в воде в соотношении 1:10, контрольный вариант содержал почву с участка Фон-2. Сравнивая контроль и варианты с ТМ, судили о металлоустойчивости выборок.

В высушенных проростках оценивали содержание низкомолекулярных антиоксидантов (НМАО), ферментов (каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы), характеризующих работу антиоксидантных систем (АОС), а также продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Проростки гомогенизировали в буферном растворе (рН 7.4). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при $t = +4^\circ\text{C}$. Метод определения содержания НМАО основан на их окислении хлоридом железа (III). Интенсивность окраски раствора определяли по стандартной методике [21]. Интенсивность

процессов ПОЛ оценивали по концентрации малонового диальдегида (MDA) – вторичного продукта, реагирующего с 2-тиобарбитуровой кислотой. Расчет производили с учетом коэффициента экстинкции окрашенного триметинового комплекса ($1.56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$) по изменению оптической плотности при длине волны 532 нм [22]. В супернатанте определяли также количество растворимого белка в ходе качественной реакции с красителем Coomassie Brilliant Blue G250 [23].

Активность супероксиддисмутазы (SOD, ЕС1.15.1.1) оценивали по ингибированию образования на свету окрашенного продукта восстановления нитросинего тетразолия с участием рибофлавина и L-метионина при 560 нм [24]. Активность фермента выражали в относительных единицах на 1 г белка по формуле: $A_{\text{SOD}} = \lg(D_{\text{к}}/D_{\text{о}})/(\lg C_{\text{б}})$, где $D_{\text{к}}$ и $D_{\text{о}}$ – оптическая плотность контрольной и опытной проб; $C_{\text{б}}$ – содержание белка в пробе, г. Активность каталазы (CAT, ЕС1.11.1.6) измеряли при 410 нм по интенсивности желтого окрашивания, образующегося в реакции перекиси водорода с солями молибдена [25]. Активность пероксидазы (POX, ЕС1.11.1.7) измеряли при 610 нм по снижению интенсивности окраски раствора при окислении перекисью водорода индигокармина [26]. Активность этих ферментов выражали в каталах (кат), что соответствует скорости реакции 1 моль восстановленного или окисленного субстрата в секунду. Измерения проводили на спектрофотометре SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA).

Для проверки статистических гипотез использовали дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Шеффе, непараметрические критерии Краскела-Уоллиса (H) и Манна-Уитни (U) в программе STATISTICA 8.0, а также метод сравнения пропорций (CI) [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика токсической нагрузки на разных площадках

Для оценки меры воздействия токсической нагрузки мы использовали содержание тяжелых металлов в почвах. Индекс суммарной токсической нагрузки рассчитывали по формуле

$$K_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \frac{C_{ji}}{C_{jf}}$$

где K_i – индекс загрязненности i -й точки; C_{ji} – концентрация j -го элемента в i -й точке; C_{jf} – концентрация j -го элемента в фоновой зоне;

Таблица 1. Содержание тяжелых металлов в почвах ($M \pm SE$; $n = 8$) и индексы токсической нагрузки в зоне влияния КМЗ и на фоновых участках

| Зона воздействия | Содержание металлов в почвах, мкг/г | | | | K_i |
|--------------------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------|
| | Cu | Cd | Pb | Zn | |
| Средние фоновые значения | 40.0 ± 5.7 | 0.56 ± 0.15 | 27.8 ± 10.7 | 43.1 ± 7.9 | 1.0 |
| КМЗ-10 | 289.4 ± 19.4 | 2.2 ± 0.23 | 108.0 ± 12.2 | 260.1 ± 40.9 | 5.2 |
| КМЗ-8 | 695.0 ± 1.1 | 4.9 ± 1.1 | 239.6 ± 109.8 | 879.1 ± 480.7 | 13.8 |
| КМЗ-5 | 914.7 ± 94.0 | 5.2 ± 0.32 | 214.4 ± 37.8 | 525.7 ± 51.1 | 13.0 |
| КМЗ-1 | 2569 ± 506 | 11.4 ± 2.4 | 586.6 ± 37.4 | 2655.4 ± 169.5 | 41.8 |

n – количество анализируемых элементов. Согласно данным табл. 1, уровни токсической нагрузки в зоне влияния КМЗ превышают фоновые значения в 5–42 раза.

Сравнение результатов с литературными данными [19] выявило довольно большие различия, несмотря на близость реперных участков по расстоянию от КМЗ, что свидетельствует о мозаичности загрязнения почв в зоне воздействия. Оценка доступности ТМ растениям *P. major*, представленная в работе [28], показала, что коэффициенты биоаккумуляции ($C_{\text{почва}}/C_{\text{корни}}$), транслокации ($C_{\text{корни}}/C_{\text{листья}}$) и обогащения ($C_{\text{листья}}/C_{\text{почва}}$) варьируют в зависимости от уровня загрязнения, но не превышают единицы для большинства микроэлементов, за исключением Cd и Sr. Простая линейная корреляция связывает концентрации ТМ в корнях и надземной массе растений и их содержанием в почвах.

Характеристика качества семенного потомства

Анализ массы 1000 шт. семян показал отсутствие значимых различий между выборками по этому показателю. Во всех выборках при проращивании смеси семян их всхожесть и выживаемость проростков были идентичны, поэтому далее приведены данные только по выживаемости проростков (рис. 2). Непараметрический анализ по этому показателю выявил значимость фактора “участок” ($H_{(7;31)} = 15.43$; $p = 0.031$). Оказалось, что выживаемость проростков в выборке Фон-1 была очень низкой и значимо отличалась от всех остальных выборок, за исключением КМЗ-1 и КМЗ-5 (критерий Шеффе, $p < 0.05$). Выживаемость проростков наиболее загрязненной ценопопуляции была минимальной и значимо отличалась от всех остальных выборок, за исключением Фон-1 (критерий Шеффе, $p < 0.05$).

Ростовые показатели (формирование настоящих листьев и рост корней) свидетельствуют о качестве работы апикальной и верхушечной

меристем. Наименьшая доля проростков с настоящим листом (% к числу выживших проростков) отмечена в выборке КМЗ-1 (рис. 3а), различия со всеми остальными выборками значимы (метод сравнения пропорций, CI). В этой выборке установлены также наименьшие показатели длины корней (рис. 3б), значимые различия установлены со всеми выборками, за исключением КМЗ-5. Кроме того, выборка КМЗ-5 значимо отличалась по длине корней от Фон-1, Фон-2, Фон-3, КМЗ-8 (критерий Шеффе, $p < 0.05$).

Поскольку корни измеряли у каждого проростка, объем выборок позволил корректно проанализировать вариационные кривые распределения этого признака. Они соответствовали нормальному распределению во всех выборках, за исключением Фон-1 ($K_{\text{эксцесса}} > 7.4$) и КМЗ-8 ($K_{\text{асимметрии}} > 1.9$). В большинстве выборок от 83 до 100% проростков имели боковые корни, исключение составила выборка КМЗ-1, где боковые корни сформировались лишь у 38% проростков.

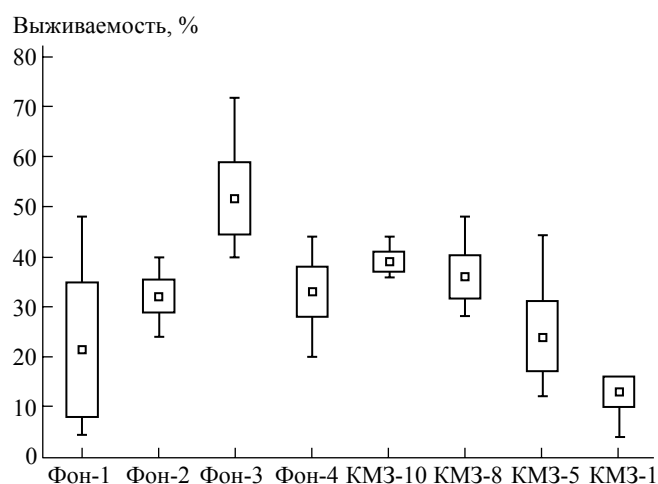


Рис. 2. Выживаемость проростков ($M \pm SE$ в боксах, усы – min-max) подорожника большого из импактных и фоновых популяций.

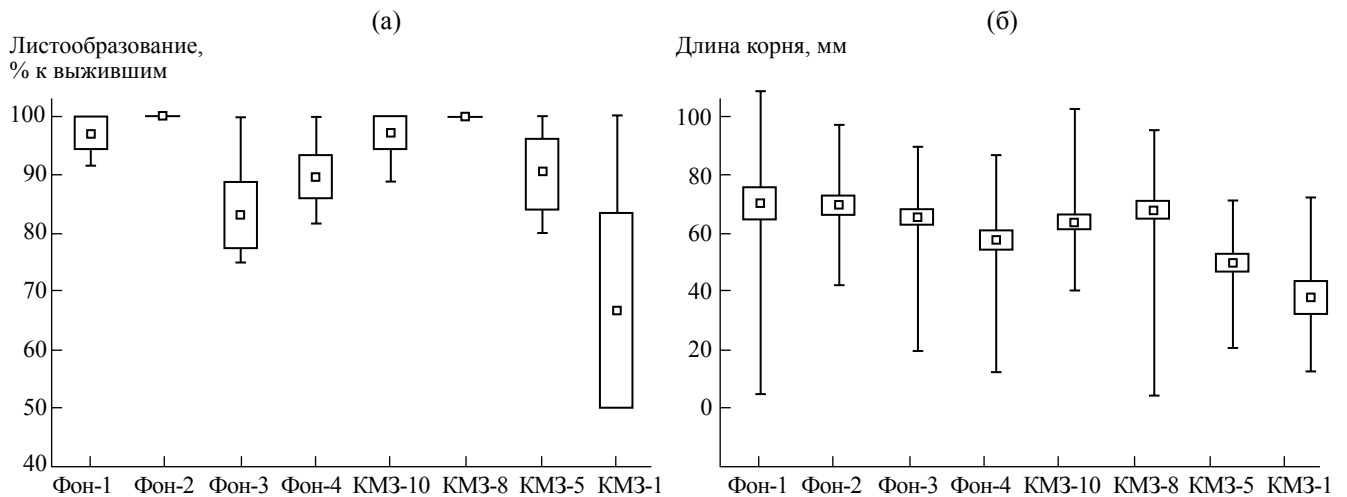


Рис. 3. Ростовые показатели у проростков подорожника из разных ценопопуляций.

Можно заключить, что в градиенте загрязнения жизнеспособность семян подорожника снижалась, семенное потомство с наиболее загрязненной площадки (КМЗ-1) было слабее остальных выборок по выживаемости проростков и ростовым показателям. Несмотря на низкую всхожесть семян из ценопопуляции Фон-1, выжившие проростки хорошо развивались.

Внутрипопуляционная изменчивость жизнеспособности

На рис. 4 представлена внутрипопуляционная изменчивость выживаемости проростков (10 индивидуальных растений на выборку). В выборке Фон-1 у половины растений потомство отличалось низкой выживаемостью ($< 25\%$), высокий коэффициент вариации ($CV = 81.8\%$) указывает на наибольшую изменчивость. В остальных выборках большая часть растений имела выживаемость 70–98%.

Обращает на себя внимание, что при индивидуальной оценке (см. рис. 4) усредненные значения выживаемости во всех выборках были в 1.7–5.4 раза выше, чем при проращивании смеси семян (см. рис. 3): различия значимы для всех выборок (U -тест, $n = 4-30$, $p < 0.05$), кроме Фон-1. Выборку КМЗ-1 при индивидуальной оценке уже нельзя относить к разряду “слабых” – различия данных I и II опытов были значимы (U -тест, $n = 4-30$, $p < 0.05$). Вероятно, такое расхождение объясняется тем, что индивидуальные растения выбирали из числа наиболее развитых, обильно плодоносящих особей, в то время как смесь содержала семена 40–50 случайно взятых растений. Выживаемость проростков в выборке Фон-1 при любом способе оценки была низкой. Неясно,

с чем именно связан этот феномен, однако очевидно, что техногенное загрязнение не имеет к этому отношения.

Внутрипопуляционная изменчивость длины корней проростков была значима ($H_{(59;180)} = 141.8$; $p < 0.0001$). Наибольший диапазон изменчивости был обнаружен в выборке Фон-1. При попарном сравнении по показателю “длина корня” все выборки значимо различались между собой (U -тест, $n = 296-666$, $p < 0.01$), кроме пары Фон-2 и КМЗ-10 (U -тест, $n = 622-626$, $p = 0.78$).

Сравнение адаптивного потенциала проростков разных ценопопуляций

Адаптивный потенциал семенного потомства разных выборок был оценен по ростовым показателям с помощью выращивания проростков на загрязненной почве с импактных участков (рис. 5). Выборки продемонстрировали парадоксальные ростовые реакции в ответ на провокационное воздействие. Так, при токсических нагрузках $K_i = 27$ и $K_i = 42$ значимое снижение листообразования наблюдалось в ценопопуляциях Фон-3, Фон-4, КМЗ-1 и КМЗ-8 (CI). Проращивание на почвенной суспензии с $K_i = 13$ вызвало значимую стимуляцию листообразования в выборках КМЗ-1, КМЗ-8, КМЗ-5 и Фон-2 (CI), причем в двух последних выборках эффект горемизиса сохранился и при более высоких уровнях токсической нагрузки. Подобные немонотонные эффекты при повышении уровня загрязнения описаны и у других видов растений [7, 8].

Значимое снижение длины корней проявилось во всех выборках при провокационном действии ТМ ($F = 173.7$, $p < 0.0001$), особенно сильной реакцией подавления была при умеренной

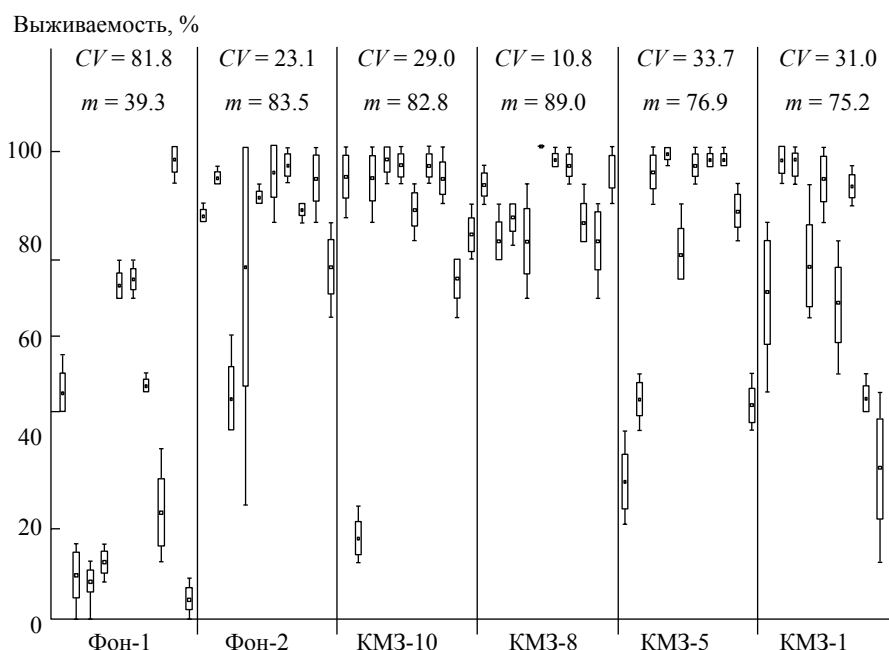


Рис. 4. Внутрипопуляционная изменчивость выживаемости проростков подорожника большого из разных зон: CV – коэффициент вариации; m – усредненная выживаемость по 10 растениям.

токсической нагрузке ($K_i = 13$). Различия между выборками в ответ на провокацию также были значимы ($F = 7.1$, $p < 0.001$). Фактически был выявлен эффект компенсации в росте листьев и корней, т.е. в вариантах, где наблюдалась стимуляция формирования листьев, рост корней был замедлен.

В целом связи металлоустойчивости семян с уровнем загрязнения почв на участках их сбора не установлено, только в реакции проростков выборки КМЗ-5 на провокационное действие ТМ можно усмотреть признаки преадаптации.

Оценка биохимического статуса проростков

Для некоторых видов растений показано, что низкомолекулярные антиоксиданты являются активными компонентами антиоксидантной системы [29–31]. Однако по нашим данным у проростков *P. major* из разных ценопопуляций содержание НМАО варьировало в очень узких пределах – от 19.3 до 20.1 мг-экв кверцетина/г сух. массы, значимых различий между выборками не обнаружено (U -тест, $p > 0.05$). Биохимические характеристики про- и антиоксидантной (ПОЛ-АО) систем подорожника из разных ценопопуляций

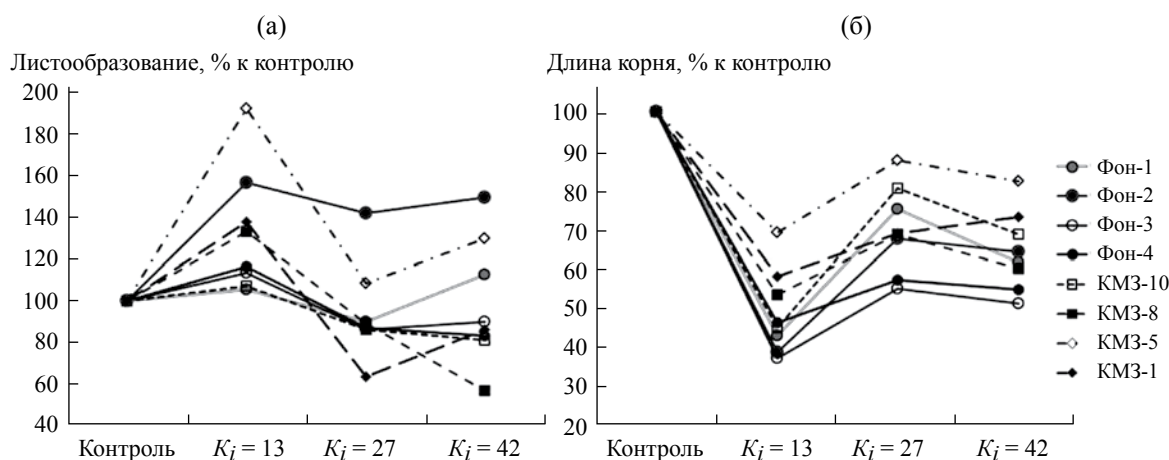


Рис. 5. Провокационное действие ТМ на формирование листьев (а) и рост корней (б) подорожника из разных ценопопуляций.

Таблица 2. Биохимические характеристики проростков подорожника (указаны медиана и 25–75-й квартили)

| Популяции | MDA, мкмоль/г белка | Активность ферментов | | |
|-----------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| | | SOD, усл.ед. | CAT, нКат/г белка | POX, нКат/г белка |
| Фон-1 | 119.9 (34.8–205.7) | 241.6 (147.1–314.4) | 117.1 (104.9–278.4) | 4421 (3441–4606) |
| Фон-2 | 33.9 (21.7–37.7) | 65.2 (59.9–153.2) | 102.0 (75.6–211.9) | 4855 (4318–5177) |
| Фон-3 | 39.3 (23.8–47.7) | 160.9 (101.7–194.9) | 246.6 (182.7–289.3) | 3943 (3393–4679) |
| Фон-4 | 16.0 (12.6–22.3) | 94.7 (73.5–111.0) | 148.1 (133.8–175.0) | 4757 (4598–4897) |
| КМЗ-10 | 15.3 (13.5–85.3) | 31.7 (23.2–104.6) | 57.2 (48.5–98.4) | 5009 (4507–5470) |
| КМЗ-8 | 23.7 (13.1–47.6) | 20.2 (6.1–75.1) | 26.8 (1.0–49.7) | 5544 (5214–5800) |
| КМЗ-5 | 21.3 (20.7–128.7) | 100.4 (7.1–126.6) | 30.4 (26.1–149.4) | 5475 (5061–5897) |
| КМЗ-1 | 71.3 (40.2–72.3) | 129.8 (71.3–136.1) | 74.6 (60.0–89.2) | 5549 (5425–5674) |

приведены в табл. 2. Объединенные выборки из зоны КМЗ значительно отличались от объединенных фоновых по активности ферментов. Так, обнаружена более низкая активность SOD (60% от фоновых; $H = 9.6$, $p < 0.002$), CAT (33%; $H = 23.1$, $p < 0.001$) и более высокая активность POX (122%; $H = 19.7$, $p < 0.001$) в зоне КМЗ. Концентрации MDA между фоновыми и выборками КМЗ не различались ($H = 0.01$, $p = 0.903$).

В фоновых выборках выявлено биохимическое разнообразие, связанное главным образом с более высоким уровнем MDA и активностью SOD в ценопопуляции Фон-1. Однако в целом различия между фоновыми популяциями были незначимы: MDA – $H = 6.7$, $p = 0.080$; SOD – $H = 4.4$, $p = 0.216$; CAT – $H = 4.9$, $p = 0.172$; POX – $H = 3.7$, $p = 0.292$. Также незначимы были различия и между импактными популяциями: MDA – $H = 2.7$, $p = 0.436$; SOD – $H = 5.5$, $p = 0.137$; CAT – $H = 5.2$, $p = 0.155$; POX – $H = 5.7$, $p = 0.129$.

Популяционную изменчивость ПОЛ-АО систем можно представить графически через многомерное сравнение биохимических данных методом главных компонент (рис. 6). Импактные и фоновые ценопопуляции оказались обособленными по ГК1, на которую приходится 58% межгрупповой дисперсии. Основной вклад в изменчивость ГК1 вносят значения SOD ($\beta = 0.84$), CAT ($\beta = -0.84$) и POX ($\beta = 0.88$). Значения ГК2 базируется на корреляции с концентрацией

MDA ($\beta = -0.91$). Связь с техногенным стрессом по ГК2 играла вспомогательную роль из-за меньшего поглощения общей дисперсии (38%). Проекция точек, принадлежащие фоновым участкам и зоне КМЗ, частично перекрывались. Импактные выборки по ориентации оказались более компактными и близкими. Внутри фоновой зоны дисперсия была

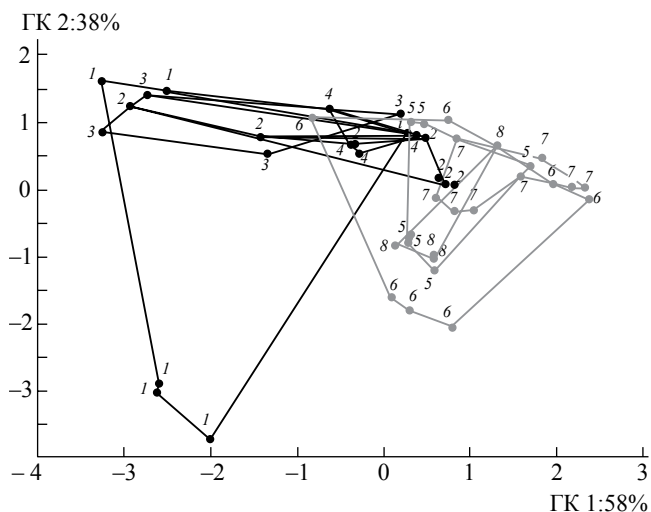


Рис. 6. Расположение фоновых выборок (1–4) и выборок из зоны КМЗ (5–8) на плоскости двух главных компонент, образованных биохимическими характеристиками: ГК1 – АО-ферменты; ГК2 – MDA; 1 – Фон-1; 2 – Фон-2; 3 – Фон-3; 4 – Фон-4; 5 – КМЗ-10; 6 – КМЗ-5; 7 – КМЗ-8; 8 – КМЗ-1.

велика, что не позволило выявить межпопуляционные различия в масштабах шкалы, образованной многомерными характеристиками. Тест Краскела-Уоллиса показал уровень значимости различий между каждой фоновой и совокупными импактными выборками по ГК1 и ГК2:

КМЗ /Фон-1: ГК1($H = 12.9$, $p = 0.001$), ГК2 ($H = 0.04$, $p = 0.841$);

КМЗ /Фон-2: ГК1($H = 3.2$, $p = 0.072$), ГК2 ($H = 4.5$, $p = 0.034$);

КМЗ /Фон-3: ГК1($H = 4.3$, $p = 0.037$), ГК2 ($H = 5.0$, $p = 0.026$);

КМЗ /Фон-4: ГК1($H = 6.4$, $p = 0.011$), ГК2 ($H = 4.6$, $p = 0.031$).

Анализ взаимосвязи между ПОЛ-АО системами

Регрессионный анализ свидетельствует об отсутствии зависимости концентрации MDA, как показателя интенсивности ПОЛ, от активности АО-ферментов – САТ и РОХ в фоновых и импактных выборках ($R = -0.008-0.26$, $p = 0.2-0.9$). В то же время связь MDA с SOD во всех выборках была положительной ($R = 0.89$, $p < 0.001$) и может быть выражена уравнением линейной регрессии $\lg Y = b_0 + b_1 \cdot X$ (рис. 7). Значение коэффициента b_1 , указывающего на силу связи между параметрами, в импактных выборках было выше (CI на фоновой территории составлял $0.003-0.005$, а в зоне влияния КМЗ – $0.006-0.008$). Увеличение коэффициента b_1 в зоне КМЗ является свидетельством прооксидантного сдвига. Проведенный расчет отношения MDA/SOD в пределах каждой ценопопуляции показал, что максимальный сдвиг относительно фоновых значений (до 175%) отмечен

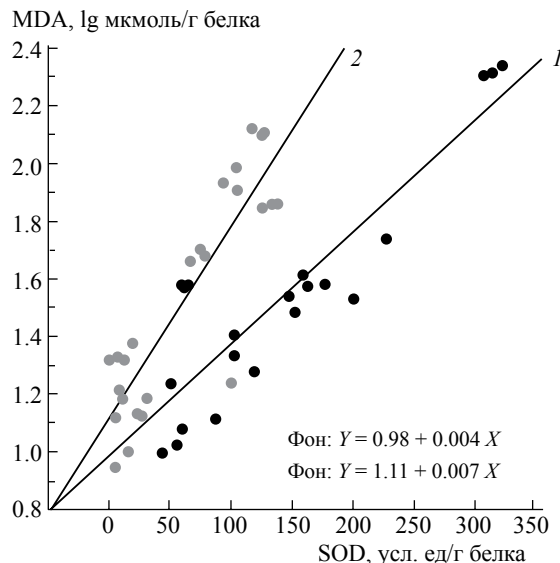


Рис. 7. Зависимость концентрации MDA от активности SOD у проростков подорожника из фоновых (1) и импактных (2) выборок.

в выборках КМЗ-5 и КМЗ-8 – уровни токсической нагрузки на этих участках превышают фоновые значения в 13.8 и 13.0 раз. В наиболее загрязненной выборке КМЗ-1 отношение MDA/SOD не отличалось от фоновых значений, хотя активности MDA и SOD были высоки. Отсутствие прооксидантного сдвига позволяет считать эти организмы адаптированными к техногенному стрессу.

Высокое отношение MDA/SOD у импактных выборок проростков ассоциировано с низким уровнем активности каталазы и высоким – пероксидазы (рис. 8). При этом сила связи между показателями

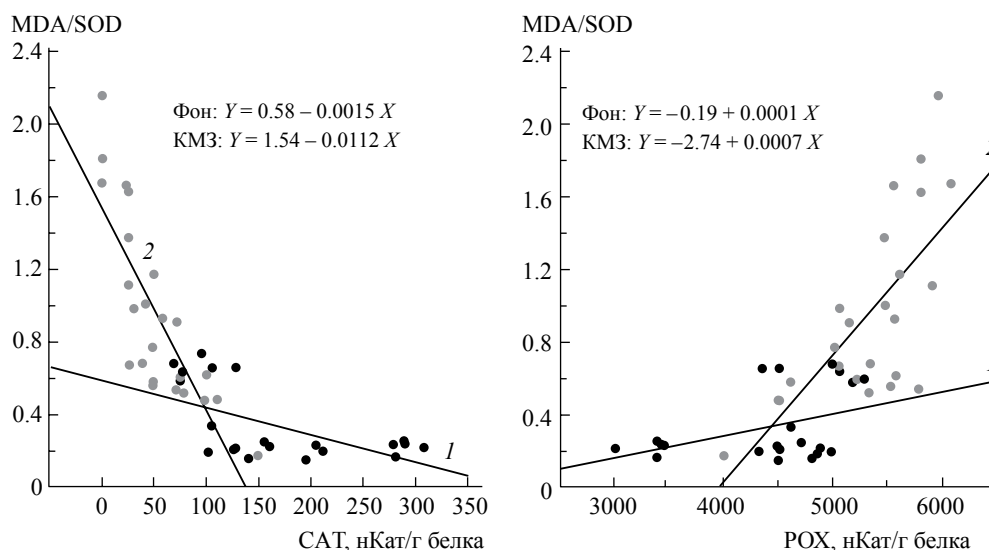


Рис. 8. Зависимость отношения MDA/SOD от активности САТ и РОХ у проростков подорожника фоновых (1) и импактных(2) ценопопуляций.

в импактных выборках была выше, чем в фоновых популяциях: КМЗ – $R_{\text{CAT}} = -0.81, p < 0.001$; $R_{\text{РОХ}} = 0.70, p < 0.001$; ФОН – $R_{\text{CAT}} = -0.61, p = 0.003$; $R_{\text{РОХ}} = 0.41, p = 0.06$. При сопоставлении ростовых и биохимических показателей у проростков из зоны влияния КМЗ была выявлена положительная корреляционная связь между листообразованием и содержанием MDA ($R = 0.90, p < 0.05$) и SOD ($R = 0.88, p < 0.05$) и отрицательная – при сопоставлении длины корней с активностью SOD ($R = -0.56, p < 0.05$).

Для фоновых выборок установлены другие коррелятивные связи. Процессы листообразования были связаны с активацией РОХ ($R = 0.49, p < 0.05$) и подавлением САТ ($R = -0.45, p < 0.05$), тогда как рост корня сопровождался снижением уровня пероксидазной активности ($R = -0.65, p < 0.05$) и усилением каталазной ($R = 0.59, p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы оценили последствия техногенного воздействия на семенное потомство *P. major*, которое сформировалось в зоне загрязнения. Установлено, что жизнеспособность семян подорожника снижалась в градиенте загрязнения мест их формирования, проростки наиболее загрязненной выборки характеризовались наименьшими выживаемостью и скоростью роста. Сходные результаты были получены нами при исследовании *P. major* в зоне воздействия Нижне-Тагильского металлургического комбината [4]. Оценка состояния про- и антиоксидантных систем у проростков фоновых и импактных ценопопуляций показала, что в выборках из зоны КМЗ ярко проявился прооксидантный сдвиг, причем максимальные отличия отношений MDA/SOD от фоновых значений отмечены в двух выборках (КМЗ-5, КМЗ-8) с уровнями токсической нагрузки, превышающими фон примерно в 13 раз. Адаптивный потенциал семенного потомства *P. major* не был связан напрямую с уровнем токсического стресса, и только в одном варианте (КМЗ-5) можно усмотреть признаки преадаптации к провокационному действию ТМ.

В обзоре [32] предложен термин “stress imprint” – отпечаток стресса, описывающий феномен устойчивого изменения метаболизма растений под воздействием различных факторов, который проявляется в следующих поколениях. Другие авторы [33, 34] подобный феномен называют “материнским эффектом”. Доказано [35], что трансгенерационный эффект имеет наследственную и ненаследственную компоненты. Стресс генерирует мобильные сигналы (например, мРНК), которые могут достигать гамет и индуцировать

метиляцию ДНК. Гиперметилованные участки подвержены высокой частоте С-Т мутаций, в то время как гипометилованные имеют более высокую частоту гомологичных рекомбинаций. Эпигенетические механизмы включают долгосрочные изменения в экспрессии генов, а также накопление метаболитов и белков в семенах, что дает потомству преимущество в росте и способствует более мощному ответу на последующие воздействия [32].

Окислительно-восстановительные системы растений, вырабатывающие активные формы кислорода (АФК): $^1\text{O}_2, \text{O}_2^{\cdot-}, \text{HO}_2, \text{HO}^{\cdot}, \text{H}_2\text{O}_2$, обеспечивают три основные функции в организмах: участвуют в метаболизме (фотосинтез, аэробное дыхание, цитохром P_{450} -зависимая монооксигеназная функция, пероксисомальное окисление и др.), играют важную сигнальную роль и в случаях токсического стресса повреждающую, поскольку при этом процессы образования АФК усиливаются [36–38]. В норме концентрации АФК в клетках незначительны в связи с высоким уровнем их реакционной способности и работой систем антиоксидантной защиты (НМАО, SOD, САТ, РОХ). При чрезмерном накоплении АФК возникает состояние, называемое оксидативным стрессом, которое принято ассоциировать главным образом с активацией ПОЛ из-за деструктивного действия, прежде всего на липопротеидные комплексы мембран [39].

Наиболее информативным показателем для мониторинга самых ранних этапов работы редокс-систем, связанных с генерированием супероксид аниона ($\text{O}_2^{\cdot-}$) является SOD [40, 41]. Фермент локализуется в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах, катализируя дисмутацию $\text{O}_2^{\cdot-}$ с образованием молекулярного кислорода или перекиси водорода [42]. Нарушение перекисного гомеостаза влечет за собой изменение активностей САТ и РОХ, причем при высоких концентрациях H_2O_2 в клетке преобладает каталазная активность, а при более низких – пероксидазная [43, 44].

Нами обнаружено, что при наибольшем токсическом воздействии (выборка КМЗ-1) отношение MDA/SOD не отличалось от фоновых значений, хотя содержание MDA и активность SOD были высоки. Отсутствие прооксидантного сдвига позволяет считать эти организмы адаптированными. В выборках с меньшим уровнем загрязнения (КМЗ-5 и КМЗ-8) прооксидантный стресс проявился в полной мере. Содержание образующейся перекиси водорода регулируется за счет активности РОХ и САТ. Во всех изученных выборках выявлено смещение соотношения “каталаза – пероксидаза” в сторону последней, причем сила связи активности РОХ

и отношения MDA/SOD у проростков импактных ценопопуляций выражена больше, чем в фоновых выборках.

Анализ литературных данных показывает, что невозможно сделать однозначных выводов относительно изменения активности ферментов АОС в присутствии разных токсикантов с варьирующими концентрациями и в изменчивых условиях среды. Предполагается, что баланс активностей разных ферментов является важным моментом эффективности работы АОС, защищающей клетки от АФК, – снижение активности одних ферментов компенсируется усилением активности других. У разных видов при разных условиях и в присутствии разных токсикантов этот баланс выстраивается специфически [3, 5, 9, 36]. Способность растений переводить свой метаболизм в особый режим, при котором происходит защитное изменение метаболизма, можно рассматривать как выработанную в процессе эволюции реакцию, сохраняющую в неблагоприятных условиях потенциал для последующих поколений.

Особо отметим, что для одной из фоновых выборок (Фон-1) была характерна низкая всхожесть семян, однако выжившие проростки показали высокие темпы роста и развития. У этих проростков выявлены более высокие уровни MDA и активности SOD. В целом в этой выборке отмечена наибольшая изменчивость как морфологических, так и биохимических показателей, и очевидно, что эти особенности не связаны с содержанием токсикантов в среде обитания. Возможно, высокая разнородность этой выборки объясняется способом расселения вида. Подорожник растет на обочинах дорог, его семена распространяются на большие расстояния на колесах машин, обуви людей. Площадка Фон-1 близка к Сугомакским пещерам – активно посещаемому туристическому объекту, поэтому высока вероятность заноса сюда семян из других регионов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-04-01023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox R.M. Air pollution effects on plant reproductive processes and possible consequences to their population biology // Air pollution Effects on Biodiversity. Ed. by J.R. Barker and D.T. Tingey. Van Nostrand Reinhold, New York: 1992. P. 131–158.
2. Pozolotina V.N., Antonova E.V., Bezel V.S. Comparison of remote consequences in *Taraxacum officinale* seed progeny collected in radioactively or chemically contaminated areas // Ecotoxicology. 2012. V. 21. № 7. P. 1979–1988. DOI: 10.1007/s10646-012-0932-1.
3. Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.
4. Позолотина В.Н., Антонова Е.В., Шималина Н.С. Адаптация *Plantago major* L. к длительному радиационному и химическому воздействию // Экология. 2016. № 1. С. 3–13. DOI: 10.1134/S1067413616010124. [Pozolotina V., Antonova E., Shimalina N. Adaptation of greater plantain, *Plantago major* L., to long-term radiation and chemical exposure // Rus. J. of Ecology. 2016. V. 47. № 1. P. 1–10.] DOI: 10.1134/S1067413616010124.
5. Zvereva E.L., Roitto M., Kozlov M.V. Growth and reproduction of vascular plants in polluted environments: a synthesis of existing knowledge // Environ. Rev. 2010. V. 18. P. 355–367. DOI: 10.1139/A10-017.
6. Elkarmi A., Eideh A.R. Allometry of *Urtica urens* in polluted and unpolluted habitats // J. Plant Biol. 2006. V. 49. № 1. P. 9–15. DOI: 10.1007/BF03030783.
7. Calabrese E.J. Hormesis: why it is important to toxicology and oxicologists // Environ Toxicol. and Chem. 2008. V. 27. P. 1451–1474. DOI: 10.1897/07-541.
8. Erofeeva E.A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses // Dose Response. 2014. V. 12. P. 121–135.
9. Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessaraki M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and anti-oxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // J. Bot. 2012. V. 2012. P. 1–26. DOI:10.1155/2012/217037.
10. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 244 с.
11. Fang W.C., Kao C.H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper, and zinc // Plant Science. 2000. V. 158. P. 71–76.
12. Деву С.Р., Прасад М.Н.В. Антиоксидантная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 233–238.
13. Sanchez-Pardo B., Fernandes-Pascual M., Zornoza P. Copper microlocalization and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess // J. Plant Res. 2014. V. 127. P. 119–129. DOI: 10.1007/s10265-013-0581-1.
14. Pozolotina V., Antonova E. Temporal variability of the quality of *Taraxacum officinale* seed progeny from the East-Ural radioactive trace: is there an interaction between low level radiation and weather conditions? // Inter. J. of Radiat. Biology, 2017. V. 93. № 3. P. 330–339.
15. Безель В.С., Позолотина В.Н., Бельский Е.А., Жуйкова Т.В. Изменчивость популяционных

- параметров: Адаптация к токсическим факторам среды // Экология. 2001. № 6. С. 447–453.
16. Онтогенетический атлас лекарственных растений / Под ред. Л.А. Жуковой. Йошкар-Ола: Марийский гос. ун-т, 1997. Вып. 1. С. 121–132.
 17. Комплексная экологическая оценка техногенного воздействия на экосистемы южной тайги / Под ред. А.М. Степанова. М.: ЦЕПЛ, 1992. 246 с.
 18. Черненко Т.В. Реакция лесной растительности на промышленное загрязнение. М.: Наука, 2002. 191 с.
 19. Сморгалов И.А., Воробейчик Е.Л. Почвенное дыхание лесных экосистем в градиентах загрязнения среды выбросами медеплавильных заводов // Экология. 2011. № 6. С. 429–435.
 20. Кайгородова С.Ю. Трансформация морфологии почв в зоне воздействия Карабашского медеплавильного завода // Вестн. Оренбургского ун-та. 2012. № 6. С. 13–17.
 21. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 429 с.
 22. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology. Ed.S. Fleischer, L. Packer. N.Y.: Academic Press, 1978. V. 52. P 302–310.
 23. Kruger N.J. The Bradford Method for Protein Quantitation // The Protein Protocols Handbook. Ed. J.M. Walker. N.Y.: Humana Press, 2002. P. 15–21.
 24. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. 1977. V. 59. № 2. P. 309–314.
 25. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clinics Chimica ACTA. 1991. V. 196. P. 143–152.
 26. Попов Т., Нейковска Л. Метод определения пероксидазной активности крови // Гигиена и санитария. 1971. № 10. С. 89–91.
 27. Newcombe R.G. Interval estimation for the difference between independent proportions: Comparison of eleven methods // Stat Med. 1998. V. 17. № 8. P. 873–890.
 28. Galat T.M., Shehata H.S. Bioaccumulation and translocation of heavy metals by *Plantago major* L. grown in contaminated soils under the effect of traffic pollution // Ecological Indicators. 2015. V. 48. P. 244–251.
 29. Прокопьев И. А., Журавская А. Н., Филиппова Г.В. Изменчивость биохимических параметров и радиоустойчивость семенного потомства дескурайнии гулявниковой и клоповника безлепестного под действием различных факторов // Экология. 2011. № 4. С. 259–265.
 30. Антонова Е.В., Каримуллина Э.М., Позолотина В.Н. Внутривидовая изменчивость дремы белой в градиенте радионуклидного загрязнения ВУРСа // Экология. 2013. № 1. С. 20–29. [Antonova E.V., Karimullina E.M., Pozolotina V.N. Intraspecific Variation in *Melandrium album* along a Radioactive Contamination Gradient at the Eastern Ural Radioactive Trace // Rus. J. of Ecology. 2013. V. 44. № 1. P. 18–27.] DOI: 10.1134/S1067413613010025.
 31. Антонова Е.В., Позолотина В.Н., Каримуллина Э.М. Изменчивость костреца безостого в условиях хронического облучения в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа // Экология. 2014. № 6. С. 459–468. [Antonova E.V., Pozolotina V.N., Karimullina E.M. Variation in the Seed Progeny of Smooth Brome Grass, *Bromus inermis* Leys., under Conditions of Chronic Irradiation in the Zone of the Eastern Ural Radioactive Trace // Rus. J. of Ecology. 2014. V. 45. № 6. P. 508–516.] DOI: 10.1134/S1067413614060034.
 32. Bruce T. J.A., Matthes M. C., Napier J. A., Pickett J.A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms // Plant Science. 2007. V. 173. P. 603–608.
 33. Maternal Effects As Adaptations. Eds. T.A. Mousseau, C.W. Fox. USA: Oxford University Press, 1998. 400 p.
 34. Galloway L.F. Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions // New Phytologist. 2005. V. 166. № 1. P. 93–99.
 35. Boyko A., Kovalchuk I. Genome instability and epigenetic modification – heritable responses to environmental stress? // Curr. Opin. Plant Biol. 2011. V. 14. № 3. P. 260–266.
 36. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Кн. дом “Университет”, 2007. 140 с.
 37. Лутова Л. А., Ежова Т. А., Додуева И. Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 432 с.
 38. Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants // J. Plant Biol. 2008. V. 51. № 3. P. 167–173.
 39. Веселова Т.В., Веселовский В.А., Чернавский Д.С. Стресс у растений. М.: Изд-во МГУ, 1993. 144 с.
 40. Raychaudhuri S. S., Deng X.W. The role of SOD in combatation oxidative stress in higher plants // Bot. Rev. 2000. V. 66. № 1. P. 89–98.
 41. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. 2002. V.53. № 372. P. 1331–1341.
 42. Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. Intra and extracellular localization of “cytosolic” CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 790–799.
 43. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. хим. 2006. Т. 46. С. 303–322.
 44. Almagro L., Gomez Ros L. V., Belchi-Navarro S. et al. Class III peroxidases in plant defense reactions // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. № 2. P. 377–390.