

Влияние техногенного пылевого загрязнения на изменение физиолого-биохимических адаптаций и радиустойчивость семенного потомства клоповника безлепестного (*Lepidium apetalum* Wild.)

И. А. ПРОКОПЬЕВ, А. Н. ЖУРАВСКАЯ, Г. В. ФИЛИППОВА

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН
677980, Якутск, просп. Ленина, 41
E-mail: a_prokopiev@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Исследовано влияние техногенного пылевого загрязнения на изменение физиолого-биохимических характеристик и их гетерогенности (вариабельности), а также на формирование радиустойчивости семенного потомства *L. apetalum*.

Показано, что более высокая степень техногенного запыления места произрастания материнских растений статистически значимо не отразилась на уровне радиустойчивости семенного потомства по сравнению с контролем, несмотря на высокое значение их антиоксидантного статуса, что, возможно, является следствием снижения вариабельности исследованных характеристик.

Ключевые слова: антропогенное пылевое загрязнение, адаптация, антиоксидантные и геномные системы, вариабельность, радиустойчивость.

Пылевое загрязнение оказывает двойное действие на живые организмы – механическое и химическое – веществами, содержащимися в пыли. Техногенное запыление автотранспортом приводит к накоплению значительного количества ионов тяжелых металлов в системе почва–растение. В настоящее время имеется много публикаций на тему промышленного загрязнения города, влияния аэротехногенного загрязнения на почву, загрязнения городских экосистем и др. [1–3]. Вместе с тем длительное воздействие загрязнителя способно вызвать в организмах растений, произрастающих на этой территории, не только токсические, но и неспецифические физиологические и биохимические адаптационные эффекты [4–7].

К таким неспецифическим адаптациям относятся изменения в системах, обеспечива-

ющих антиоксидантно-прооксидантное стационарное состояние, функциональная активность и устойчивость генетического аппарата. Поэтому ответная реакция организма и биоты на действие загрязнений окружающей среды будет зависеть не только от природы и интенсивности данных стресс-факторов, но и от исходной активности систем антиоксидантной защиты и систем, обеспечивающих активность и устойчивость генома, а также от их вариабельности [8–10].

Дополнительное провокационное воздействие на семена γ -квантами позволяет выявить их скрытый адаптационный потенциал и построить кривые “доза – эффект” выживаемости семенного потомства для определения радиустойчивости растений. Адаптационный потенциал складывается из наличия в тканях эндогенных протекторов (например,

низкомолекулярных и ферментативных антиоксидантов), уровня физико-химической защищенности, плоидности, эффективности работы восстановительных систем (репарация) и др. [8–11].

Тем не менее исследований, посвященных изучению влияния различных по своей природе и интенсивности стресс-факторов среды на изменение физиологических, биохимических характеристик и радиостойкости растений, произрастающих в экстремальных условиях криолитозоны, очень мало [4, 9].

Цель данного исследования – выявить влияние техногенного пылевого загрязнения на физиолого-биохимические характеристики и радиостойкость семенного потомства *Lepidium apetalum*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стал клоповник безлепестный (*Lepidium apetalum* Wild.), семейство крестоцветные (Brassicaceae) – сорное растение, произрастающее на щебнистых склонах, лугах, степях, залежах и у дорог [12]. Выбор обусловлен тем, что растение – космополит, имеется в большом количестве в местах компактного произрастания, дает много семян с высокой степенью всхожести. В каждой выборке 20 растений.

Семена по 50 шт. проращивали в чашках Петри на фильтрах при комнатной температуре (20–24 °С), с освещением – 16 ч в сутки в четырех повторностях. Критериями оценки адаптационного потенциала семенного потомства растений служили: выживаемость проростков на 30-е сут наблюдения на стадии настоящего листа, %; митотическая активность меристематических клеток корней проростков, МИ, %, определяемая по методике З. П. Паушевой [13]; суммарное содержание низкомолекулярных антиоксидантов, НМАО, мкг-экв_{кверц}/г_{пр}, по методу В. С. Асатиани [14]; активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) по методу N. G. Constantine и K. R. Stanley [15] и пероксидазы, мкмоль/(мин · г_{пр}), по методу А. И. Ермакова и В. В. Арасимовича [16]; скорости включения ³Н-тимидина, фмоль/(сут · г_{пр}), в молекулы ДНК в процессах репликативно-

го и репаративного синтеза и ¹⁴С-лейцина, пмоль/(сут · г_{пр}), в синтезируемые белки клеток проростков [17]; интенсивность процессов перекисного окисления липидов, ПОЛ, ммоль/г_{пр} по накоплению малонового диальдегида [18].

Репаративную способность, общую относительную устойчивость и активность генома клеток проростков рассчитывали, применяя комплексную цитолого-биохимическую методику, в которой использованы цитологический и биохимический подходы [11, 19]. Метод включает определение интегрального значения активности антиоксидантных систем, одновременное определение включения ³Н-тимидина в ДНК и ¹⁴С-лейцина в синтезируемые белки для оценки суммарной активности процессов репликативного и репаративного синтеза ДНК и трансляции мРНК при биосинтезе белков соответственно, а также определение митотического индекса делящихся клеток для оценки скорости репликации ДНК, лежащей в основе клеточного деления. В рамках разработанного метода все характеристики выражались в относительных единицах, нормированных к контролю. За контроль приняты характеристики семенного потомства материнских растений, произраставших в условиях минимального пылевого загрязнения ((0,3 ± 0,03) г/(м² · сут)).

Коэффициент интегрального значения активности антиоксидантных систем ($k_{\text{аоз/пол}}$) рассчитывали по уравнению (1):

$$k_{\text{аоз/пол}} = (([\text{содержание НМАО}]_N + [\text{активность СОД}]_N + [\text{активность пероксидазы}]_N) / 3) / [\text{ПОЛ}]_N. \quad (1)$$

Активность генома оценивали:

- в процессах репликации ($k_{\text{репл}}$) – нормированной величиной [митотический индекс]_N;
- в процессах репарации ($k_{\text{реп}}$) – нормированной величиной ([включение ³Н-тимидина]_N – [митотический индекс]_N + 1);
- в процессах трансляции белков ($k_{\text{трансл}}$) – нормированной величиной [включение ¹⁴С-лейцина]_N.

Общую активность генома ($k_{\text{оар}}$) описывали уравнением (2):

$$k_{\text{оар}} = (k_{\text{репл}} + k_{\text{реп}} + k_{\text{трансл}}) / 3. \quad (2)$$

С учетом вклада в устойчивость генома активности систем антиокислительной защи-

ты ($k_{\text{аоз/пол}}$) и репарации ДНК вычисляли в относительных единицах коэффициент общей относительной устойчивости генома ($k_{\text{уг}}$) клеток в отношении любых по природе стресс-факторов среды. При этом использовали представление о том, что величина слагаемого устойчивости генома, связанного со значением $k_{\text{реп}}$, обратно пропорциональна степени диспергированности его конформации или его объему, которая, в свою очередь, пропорциональна его общей активности (3):

$$k_{\text{уг}} = (k_{\text{аоз/пол}} + k_{\text{реп}} / k_{\text{оар}}) / 2. \quad (3)$$

В расчетах по формулам учитывались только характеристики, статистически отличные от контроля.

Для определения степени поверхностного загрязнения отобрали пробы снега в исследуемых точках в четырех повторностях. Пробу брали с ненарушенного снежного покрова, измеряли глубину снега (30 см) и его площадь ($0,25\text{ м}^2$), при этом от поверхности земли оставляли примерно 2 см. Снег растапливали, воду выпаривали и взвешивали оставшийся осадок, характеризующий степень запыления данной точки отбора. Расчет запыления приведен в $\text{г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$ [4].

Воздушно-сухие семена подвергали провोकационному воздействию острого γ -излучения от источника ^{60}Co при мощности дозы $0,094 \text{ Гр/с}$ в диапазоне от 10 до 500 Гр. Критерием оценки радиостойчивости облученных семян была выживаемость проростков на 30-й день наблюдения, когда появлялся настоящий лист, так как на этой стадии начинают активно функционировать меристемы (апикальная и корневая) – критические ткани растений и наиболее ярко проявляются отдаленные последствия облучения, вплоть до массовой гибели проростков. Известно, что ионизирующее излучение изменяет скорость роста, задерживает или ускоряет развитие растений. Уровень радиостойчивости семян

характеризовали интегральным значением полулетальной дозы на 30-й день наблюдения ($\text{ЛД}_{50/30}$) [8].

Значимость отличия от контроля оценивали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни (U -критерий Манна – Уитни) при уровне значимости $p < 0,05$ [20]. Значение стандартной ошибки среднего, коэффициента вариации и полулетальной дозы рассчитывали с использованием пакета AnalystSoft, StatPlus – программа статистического анализа, v.2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Семена *L. apetalum* собраны на территории г. Якутска на расстоянии 10 м от проезжей части дороги (табл. 1; т. 2), где уровень пылевого загрязнения составлял $(6,9 \pm 0,69) \text{ г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$. В качестве контроля взяты семена растений, произрастающих в 10 км от города на достаточном удалении от проезжих частей (т. 1) с уровнем запыления $(0,3 \pm 0,03) \text{ г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$.

Анализ содержания ряда тяжелых металлов в исследованной пыли проведен в аналитическом центре Всероссийского геологического института им. А. П. Карпинского методом ICP–MS. Пыль, собранная в т. 2, отличалась от контроля по содержанию только четырех элементов из 15 исследованных (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Pb, V, Cd, Ti, Sr, Mo, W) (см. табл. 1). Установлено, что в придорожной пыли увеличено содержание меди в 2, цинка – в 2,7, молибдена – в 3,4 и свинца – в 2 раза по сравнению с наличием этих элементов в контрольной пробе пыли.

В табл. 2 представлены физиологические и цитолого-биохимические характеристики проростков семенного потомства *L. apetalum*, материнские растения которых произрастали при разных условиях запыления. Установлено, что у семенного потомства растений, произраставших в условиях хронического

Т а б л и ц а 1

Содержание тяжелых металлов в пыли ($\text{мг}/\text{кг}$) в зависимости от степени техногенного загрязнения места произрастания *L. apetalum*

| Номер точки | Запыление, $\text{г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$ | Cu | Zn | Mo | Pb |
|-------------|---|------|-------|-----|------|
| 1 | $0,3 \pm 0,03$ | 16,3 | 53,8 | 0,7 | 8,3 |
| 2 | $6,9 \pm 0,69$ | 33,5 | 143,0 | 2,4 | 16,6 |

Физиологические и цитолого-биохимические характеристики проростков семенного потомства *L. apetalum*

| Номер точки | Содержание НМАО, мкг-экв _{кверц} /г _{пр} | Активность ферментов, мкмоль/(мин · г _{пр}) | | Скорость включения | | МИ, % | Концентрация малонового диальдегида, ммоль/г _{пр} |
|-------------|--|---|-------------|--|--|-----------|--|
| | | СОД | пероксидаза | ³ Н-тимидина, фмоль/сут · г _{пр} | ¹⁴ С-лейцина, пмоль/сут · г _{пр} | | |
| 1 | 1,7 ± 0,1 | 0,8 ± 0,2 | 1,2 ± 0,1 | 2,4 ± 0,3 | 1,8 ± 0,2 | 1,8 ± 0,2 | 2,4 ± 0,2 |
| 2 | 3,6 ± 0,1* | 1,5 ± 0,2* | 1,6 ± 0,2* | 3,1 ± 0,5 | 2,1 ± 0,3 | 1,7 ± 0,1 | 1,4 ± 0,1* |

П р и м е ч а н и е. * – различия статистически значимы по сравнению с контролем $p < 0,05$ (U -критерий Манна – Уитни).

техногенного запыления (т. 2), активность всех исследованных нами антиоксидантных систем была выше контрольных значений (т. 1). Суммарное содержание НМАО увеличено в 2 раза, активность ферментов СОД и пероксидазы – на 87,5 и 33,3 % соответственно. Интенсивность процессов ПОЛ была ниже на 58,3 % у проростков, произраставших при запылении, что говорит о более высоком антиоксидантном статусе исследованных растений. Активность процессов репликации и трансляции (по скорости включения ³Н-тимидина и ¹⁴С-лейцина) и митотическая активность корневой меристемы у проростков растений обеих групп статистически достоверно не различались.

Таким образом, установлено, что длительное произрастание материнских растений *L. apetalum* в условиях хронического техногенного пылевого воздействия привело к увеличению в 3 раза значения $k_{\text{аоз/пол}}$, что, в

свою очередь, повысило устойчивость генома ($k_{\text{уг}} = 2,0$) их семенного потомства к данным условиям произрастания (табл. 3). Вместе с тем вариабельность коэффициентов биологически важных показателей у семенного потомства растений, выросших в условиях техногенного запыления, имеет общую тенденцию к снижению относительно контроля (табл. 4). Например, вариабельность коэффициента общей антиоксидантной защиты ниже в 1,5 раза, репарации – в 1,2, устойчивости генома – в 2,5 раза, т. е. действие хронического техногенного пылевого загрязнения на *L. apetalum* привело к снижению внутривидового разнообразия. Возможно, уменьшение вариабельности связано с сильным токсическим и мутагенным действием тяжелых металлов, содержащихся в пыли.

Острое дополнительное воздействие на семена клоповника безлепестного γ -квантами ⁶⁰Со позволило построить дозовые кривые

Т а б л и ц а 3

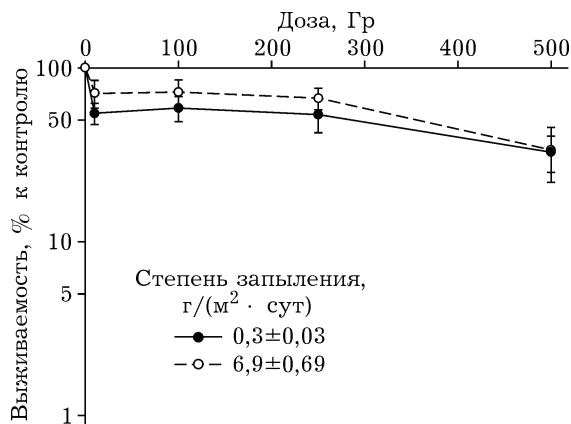
Значения коэффициентов антиоксидантной защиты, общей активности генома, репарации, общей относительной устойчивости генома клеток семенного потомства *L. apetalum* (нормировано относительно контроля)

| Номер точки | $k_{\text{аоз/пол}}$ | $k_{\text{оаг}}$ | $k_{\text{реп}}$ | $k_{\text{уг}}$ |
|-------------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|
| 1 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 2 | 3,1 | 1,0 | 1,0 | 2,0 |

Т а б л и ц а 4

Значения вариабельности (%) коэффициентов антиоксидантной защиты, общей активности генома, репарации, общей относительной устойчивости генома клеток и значения полудетальной дозы семенного потомства *L. apetalum*

| Номер точки | $Vk_{\text{аоз/пол}}$ | $Vk_{\text{оаг}}$ | $Vk_{\text{реп}}$ | $Vk_{\text{уг}}$ | $LD_{50/30}$, Гр |
|-------------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| 1 | 41,1 | 28,4 | 59,8 | 60,5 | 331,3 ± 35,4 |
| 2 | 27,5 | 27,9 | 48,6 | 24,4 | 361,9 ± 25,7 |



Выживаемость проростков семенного потомства клеовника безлепестного в зависимости от дозы облучения при различной степени техногенного запыления места произрастания материнских растений (нормировано относительно контроля)

выживаемости семенного потомства (см. рисунок). Показано, что более высокая степень техногенного запыления ($(6,9 \pm 0,69) \text{ г}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$) места произрастания материнских растений статистически значимо не отразилась на радиоустойчивости семенного потомства по сравнению с контролем (см. табл. 4). Известно, что радиоустойчивость популяций дикорастущих растений определяется не только физиолого-биохимическими характеристиками, но и их вариабельностью [9, 10]. В данном случае радиоустойчивость растений двух исследованных популяций не отличалась, что может быть следствием уменьшения вариабельности исследованных характеристик и высокого антиоксидантного статуса растений, либо испытывающих влияние техногенного запыления, либо нет — в контроле.

ВЫВОДЫ

Установлено, что длительное произрастание материнских растений *L. apetalum* в условиях хронического загрязнения пылью, содержащей тяжелые металлы, увеличило суммарное содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активировало ферментативные, что, в свою очередь, привело к повышению устойчивости генома их семенного потомства к данным условиям произрастания. При этом у растений, испытывающих хро-

ническое загрязнение пылью, наблюдалось снижение вариабельности всех исследованных характеристик, которое может быть связано с сильным токсическим и мутагенным действием тяжелых металлов, содержащихся в пыли.

Показано, что произрастание *L. apetalum* в условиях хронического техногенного запыления не влияет на радиоустойчивость их семенного потомства, несмотря на высокое значение их антиоксидантного статуса, что, возможно, является следствием снижения вариабельности физиолого-биохимических характеристик.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 12-04-98501-р-восток-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларина Г. Е., Обухов А. И. Тяжелые металлы в растительности с газонов вдоль автомагистралей // Вести МГУ. 1995. № 3. С. 41–48.
2. Демин В. В. Роль гуминовых кислот в необратимой сорбции и биогеохимии тяжелых металлов в почве // Изв. Тимирязев. с.-х. акад. 1994. № 2. С. 19–86.
3. Ozaki H., Watanabe I., Kuno K. As, Sb and Hg distribution and pollution sources in the roadside soil and dust around Kamikochi, Chubu Sangaku National Park, Japan // Geochemical J. 2004. Vol. 38. P. 473–484.
4. Шашурин М. М., Журавская А. Н. Изучение адаптивных возможностей растений в зоне техногенного воздействия // Экология. 2007. № 2. С. 93–98.
5. Bohnert N., Sheveleva E. Plant stress adaptations — making metabolism move // Plant Biologi. 1998. Vol. 1. P. 267–274.
6. Schutzendubel A., Polle A. Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by micorrhization // J. of experimental botany. 2002. Vol. 53, N 372. P. 1351–1365.
7. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // Polish J. of Environ. Stud. 2006. Vol. 15, N 4. P. 523–530.
8. Гродзинский Д. М. Радиобиология растений. Киев: Наук. думка, 1989. 380 с.
9. Журавская А. Н., Воронов И. В., Прокопьев И. А. Влияние вариабельности физиолого-биохимических характеристик на радиочувствительность эоформ лебеды раскидистой (*Atriplex patula* L.) и полыни чернотыльничка (*Artemisia vulgaris* L.) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46, № 1. С. 85–90.
10. Позолотина В. Н. Отдаленные последствия действия радиации на растения. Екатеринбург: Академкнига, 2003. 244 с.
11. Журавская А. Н., Филиппов Э. В., Кершенгольц Б. М. Влияние биохимических адаптаций ольхи кустарниковой (*Duschecia fruticosa* (Rupr)) к повышенному естественному радиационному фону на выжива-

- емость проростков и радиочувствительность ее семян // Радиационная биология. Радиэкология. 2000. Т. 40, № 3. С. 254–260.
12. Андреев В. Н., Галактионова Т. Ф., Горовой П. Г., Караваев М. Н., Леонова Т. Г., Липшиц С. Ю., Михалева В. М., Пермякова А. А., Перфильева В. И., Скворцов А. К., Толмачев А. И., Чугунова Р. Н. Определитель высших растений Якутии. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1974. 544 с.
 13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. 288 с.
 14. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. 740 с.
 15. Constantine N. G., Stanley K. R. Superoxide Dismutases in hanger plants // *Plant Physiol.* 1977. Vol. 59. P. 309–314.
 16. Ермаков А. И., Арасимович В. В. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1987. 456 с.
 17. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорозом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. 304 с.
 18. Рогожин В. В. Методы биохимических исследований. Якутск: ЯГУ, 1999. 93 с.
 19. Захаров В. М., Баранов А. С., Борисов В. И., Валецкий А. В., Кряжева Н. Г., Чистякова Е. К., Чубинишвили А. Т. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.
 20. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.

Influence of Man-Made Dust Pollution on Physiological and Biochemical Adaptations and Radiostability of Seed Progeny of *Lepidium apetalum* (*Lepidium apetalum* Wild.)

I. A. PROKOPIEV, A. N. ZHURAVSKAYA, G. V. FILIPPOVA

Institute of biological problems of cryolitozone SB RAS
677980, Yakutsk, Lenin ave., 41
E-mail: a_prokopiev@mail.ru

The influence of man-made dust pollution on the changes of the physiological and biochemical characteristics, and their heterogeneity (variability), as well as on the radiostability of seed progeny of *L. Apetalum* was investigated.

It was shown that a higher degree of man-made dust pollution of growing place of parent plants had no impact on the level of radiostability of seed progeny, compared with the control, despite the higher value of antioxidant status in their seed progeny, which is probably a consequence of reduced variability of the investigated characteristics.

Key words: man-made dust pollution, adaptation, antioxidant and genomic systems, variability, radiostability.