

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ГОРОДСКИХ ЛЕСАХ г. БИЙСКА

Г.И. Егоркина, Е.А. Валетова

Изучены цитогенетические показатели сосны обыкновенной в лесном массиве с признаками дигрессии, вызванной загрязнением выбросами теплоэлектростанции. Показало, что при высоком уровне загрязнения проявляются цитотоксические свойства загрязнителей, а уровень мутирования равен контрольному. При снижении загрязнения наблюдаются генетические эффекты – достоверное повышение аберраций хромосом в корневой меристеме проростков. Индивидуальный учет цитологических показателей каждого дерева выявил высокую гетерогенность популяции по признакам устойчивости к химическим загрязнителям и мутабельности.

ВВЕДЕНИЕ

Общая площадь лесов, расположенных в границах городской черты г. Бийска (Алтайский край), составляет 4293 га. Основная часть их расположена на правом берегу рек Бия и Обь. Сосна обыкновенная является здесь основной древесной породой – ею занято 88.6% площади. Доминирование сосны обусловлено наличием хорошо дренированных слабоподзолистых супесчаных свежих почв, которые являются оптимальными для произрастания этого вида, но малоприспособлены для других древесных пород. Основная масса сосновых насаждений относится к высокопродуктивным средневозрастным и высокополнотным. Они отличаются высокими средозащитными и санитарно-гигиеническими функциями. Однако загрязнение атмосферы промышленными предприятиями города представляет угрозу для лесных экосистем. Как показали исследования [1], лесные экосистемы являются пассивными фильтраторами потоков токсикантов и проходит ряд последовательных стадий разрушения фитоценоза. Скорость прохождения изменений в сообществах прямо пропорциональна интенсивности техногенеза.

Одним из наиболее значимых техногенных источников загрязнения в г. Бийске является ТЭЦ-1, расположенная в западной наветренной части города [2]. В радиусе 2 км от источника загрязнения отчетливо видны признаки дигрессии леса: в течение последних 20-25 лет не появляется вообще подрост сосны, до 63% деревьев имеют видимые морфологические изменения. По мере удаления от источника загрязнения доля таких деревьев уменьшается почти в два раза, повышается продолжительность жизни хвои, ее длина и масса, снижается удельный вес сухих ветвей в кроне, появляется подрост [3].

Представляет интерес изучить действие загрязнителей, поступающих от ТЭЦ-1, на наследственный аппарат растений, что важно как для оценки состояния лесной экосистемы, так и для индикации состояния среды обитания человека. Сосна является одним из основных природных тест-объектов эколого-генетического мониторинга в связи с ее широким ареалом и высокой чувствительностью базирующихся на ней тест-систем. Наиболее чувствительны к воздействию широкого спектра антропогенных поллютантов репродуктивные органы хвойных растений. Длительный цикл развития семян – более двух лет, даже при низких концентрациях поллютантов приводит к накоплению количества поврежденных ДНК, достаточного для индикации внешнего воздействия [4]. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение частоты хромосомных мутаций в корневой меристеме проростков семян из популяций сосны обыкновенной, различно удаленных от источника загрязнения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили семена сосны, собранные в 2002 году на территории Бийского лесхоз-техникума в сосновых насаждениях на трех учетных площадках:

1 площадка – кварталы № 38 и №95, удаленность от ТЭЦ-1 1-1.5 км;

2 площадка – квартал № 28, удаленность 5 км;

3 площадка – квартал №39, удаленность 10 км (условный контроль).

В каждом квартале выбирали по три, пять модельных деревьев, таксационная характеристика их приведена в таблице 1.

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ГОРОДСКИХ ЛЕСАХ
Г. БИЙСКА**

Таблица 1
Таксационная характеристика
модельных деревьев

Номер дерева	A, лет	h, м	Zh, м	d _{1.3} , см	Zd, см
1 учетная площадка (1-1.5 км)					
95/1	50	16	0.44	12	0.05
95/2	120	26.5	0.37	42	0.05
95/3	103	21	0.4	32	0.06
38/1	92	29	0.12	40	0.06
38/3	76	19	0.22	20	0.05
2 учетная площадка (5 км)					
28/1	85	24.5	0.1	24	0.05
28/2	73	19	0.56	16	0.02
28/3	115	26.2	0.26	36	0.04
3 учетная площадка (10 км)					
39/1	110	20	0.25	36	0.05
39/2	120	15	0.23	12	0.04
39/3	85	26	0.75	28	0.03

A – возраст дерева; h- высота дерева;
Zh – прирост по высоте;
d_{1.3} -диаметр на высоте 1.3 м;
Zd – прирост по диаметру

Семена, с каждого дерева отдельно, делили по цвету на цветосеменные расы, прощипывали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Проростки длиной 1–2 см фиксировали в спиртоуксусной смеси (3:1). Предобработку и окрашивание материала проводили по методике, разработанной для плодовых культур [5]. Временные давленные препараты готовили в собственной модификации: вместо 45%-ной уксусной кислоты использовали лимонную (15 г на 100 мл воды). Препараты, приготовленные на растворе лимонной кислоты, медленно высыхают и хранятся продолжительное время. Кроме того, лимонная кислота нелетучая, безопасна для здоровья исследователя.

На препаратах анализировали анатомофазные клетки, учитывая все встречающиеся повреждения хромосом: мосты одиночные и двойные, фрагменты, отставшие и кольцевые хромосомы, микроядра.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Загрязнение воздуха в городах – одна из наиболее актуальных проблем для урбанизированных территорий. В большинстве промышленных городов по приоритетным загрязняющим веществам – общей пыли, оксидам азота, серы и углерода, а также токсич-

ным химическим элементам, наблюдаются обширные химические аномалии [6]. Поверхность растений обеспечивает в значительной степени фильтрацию воздуха от загрязнения и перенос загрязняющих веществ к другим компонентам биосферы. Очищение воздуха происходит не только путем осаждения поллютантов, но и поглощения их тканями растений.

Многие токсичные тяжелые металлы (медь, цинк, кобальт и др.) являются биологически активными микроэлементами, поэтому для некоторых из них нет барьеров при поступлении в растения и они могут накапливаться в значительных количествах в органах, тканях и субклеточных структурах. При высоких концентрациях такие металлы оказывают неблагоприятное воздействие на живые организмы. Высокотоксичные металлы, не играющие существенной роли в процессах жизнедеятельности, опасны для организмов при относительно малых концентрациях (свинец, ртуть).

Многочисленными экспериментами с биологическими объектами разного уровня организации показано, что соли тяжелых металлов обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. Являясь метаболическими ядами, действующими на энергетику клетки, фотосинтез и регуляторные процессы, многие тяжелые металлы способны существенно модифицировать выход генетических повреждений, а некоторые из них непосредственно взаимодействовать с молекулой ДНК. Тяжелые металлы способны оказывать влияние на эффективность процессов репарации. Показано также, что тяжелые металлы как мутагены обладают специфическими свойствами. Специфика их заключается в том, что химические агенты, проходя через метаболическую систему организма, изменяются самым непредсказуемым образом. Они могут потерять, приобрести или усилить свою мутагенную активность. Изменять мутагенные свойства отдельных металлов могут и сопутствующие загрязнители.

ТЭЦ-1 г.Бийска работает на каменных углях Кузнецкого и Канско-Ачинского бассейнов, в которых установлены в повышенных концентрациях тяжелые металлы, относящиеся к низкотоксичным – олово, марганец, германий, и высокотоксичным – свинец, цинк, медь. Из высокотоксичных также присутствуют ванадий, кобальт, никель, ртуть и другие элементы. Аномально высокое содержание некоторых из них, в частности, цинка и свинца, обнаружено в почвах, твердом остатке снеговых проб и растениях при проведе-

нии геоэкологического мониторинга г. Бийска [2].

Результаты цитологического анализа митоза в клетках корневой меристемы проростков семян сосны, собранных на различно удаленных от источника загрязнения участках, представлены в таблице 2 – частота нарушений, и в таблице 3 – спектр нарушений. Показана стабильность митоза в потомстве каждого модельного дерева отдельно и в среднем на учитываемой площади. Где было возможно, сравнивали цитогенетические показатели проростков семян в зависимости от расположения шишек в кроне дерева (верхний и средний ярусы) и цвета семян.

Средние частоты клеток с абберациями хромосом и частоты аббераций на 100 клеток вблизи от ТЭЦ-1 (1 площадка), и на контрольной площадке (3) примерно равны (таблица 2). Наиболее выражена генотоксичность поллютантов на второй учетной площадке, находящейся в пятикилометровой зоне – здесь выход аббераций почти в два раза выше. Показатели достоверно различаются при

95%-ном уровне значимости. Низкая частота аббераций хромосом на самом загрязненном участке объясняется, по-видимому, тем, что в двухкилометровой зоне загрязнители накапливаются в растениях до таких высоких концентраций, когда проявляются токсические эффекты. При удалении от ТЭЦ-1 загрязнение уменьшается до концентраций, вызывающих мутагенный эффект. Такая же тенденция прослеживается вдоль кроны деревьев: в верхнем более загрязненном ярусе деревьев 95/3 (1 учетная площадка) и 28/3 (2 учетная площадка) проростки семян имеют меньше аббераций хромосом, чем проростки из нижнего яруса.

Нелинейный характер зависимости выхода аббераций хромосом при воздействии различных концентраций тяжелых металлов показан в экспериментальных работах. В экспериментах с проростками пшеницы [7] показано, что кривая зависимости выхода структурных мутаций от концентрации алюминия в водном растворе имеет колоколообраз-

Таблица 2

Частота абберантных клеток (АК) в корневой меристеме проростков сосны обыкновенной

№ дерева	Изучено		Частота АК, %		Нагруженность клеток абберациями	Частота аббераций на 100 клеток, %
	проростков	клеток	всего	из них с множественными абберациями		
1 учетная площадка (1-1.5 км)						
95/1	18	1631	0.67±0.21	27.3	1.36	0.92
95/2	16	670	1.49±0.47	30	1.50	2.24
95/3 в с	88	5834	0.68±0.15	11.1	1.14	0.78
	18	1800	1.11±0.24	15	1.20	1.33
38/1	30	2227	0.54±0.15	16.7	1.17	0.63
38/3	8	696	0.86±0.36	0	1	0.86
Среднее			0.77±0.08	15.3±3.2	1.22	1.08±0.08
ДИ			0.62-0.92			1.00-1.16
2 учетная площадка (5 км)						
28/1	53	2643	2.76±0.32	17.8	1.23	3.40
28/2	46	3498	2.09±0.24	9.6	1.11	2.32
28/3 в с	77	3990	0.38±0.10	6.7	1.07	0.40
	29	1930	0.52±0.16	15.4	1.30	0.67
Среднее			1.44±0.11	14.6±2.8	1.18	1.70±0.12
ДИ			1.22-1.66			1.58-1.82
3 учетная площадка (10 км)						
39/1	58	3573	0.39±0.10	7.1	1.14	0.45
39/2	37	2710	0.50±0.18	12.5	1.10	0.55
39/3	70	3727	2.07±0.23	12.5	1.25	2.58
Среднее			1.01±0.10	13.4±3.9	1.17	1.04±0.11
ДИ			0.81-1.21			0.93-1.15

ДИ – 95%-ный доверительный интервал; в – верхний ярус; с – средний ярус

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ГОРОДСКИХ ЛЕСАХ
Г. БИЙСКА**

разный вид. Пик мутагенной активности проявляется у разных солей алюминия при различных концентрациях.

В вегетационном эксперименте по изучению индукции генетических эффектов ионизирующим излучением и тяжелыми металлами в листовой меристеме ячменя [8] показано, что при действии малых доз и концентраций выход цитогенетических нарушений растет быстрее, чем при высоких. При загрязнении почвы свинцом частота абберрантных клеток резко возрастала при малых концентрациях (40-50 мг/кг почвы) с последующей стабилизацией на уровне, в два раза превышающем спонтанный. Даже при концентрациях 200-500 мг/кг частота нарушений оставалась постоянной. При загрязнении почвы кадмием максимальную частоту абберрантных клеток наблюдали при концентрациях 10-20 мг/кг, а затем количество нарушений резко снижалось. Причем, уменьшение выхода абберрантных клеток было настолько сильно, что их количество при концентрации 100 мг/кг достоверно не отличалось от такового в контроле. Авторы связывают это с цитотоксическим действием металлов.

Косвенным подтверждением цитотоксического действия поллютантов ТЭЦ-1 может служить тот факт, что нагруженность клеток повреждениями – частота клеток с множественными абберрациями, число абберраций на клетку (таблица 2), напротив, максимально

на самом загрязненном участке. По мере уменьшения загрязненности наблюдается тенденция снижения значений этих показателей, хотя различия недостоверны. Вероятно, большое количество повреждений в отдельных клетках приводит их к гибели и вследствие этого изменяется процентное отношение нормальных и абберрантных клеток. Увеличение нагруженности клеток повреждениями с ростом концентрации тяжелых металлов в почве отмечено в эксперименте [9].

Если рассмотреть спектр мутаций (таблица 3), то можно заметить, что при максимальном уровне нарушений (пятикилометровая зона) более половины абберраций составляют хроматидные мосты. На самом загрязненном участке высока доля геномных мутаций – отставших и кольцевых хромосом. Изменение спектра мутаций в зависимости от концентрации тяжелых металлов наблюдали в экспериментах по изучению действия солей кадмия на корневую меристему *Steris capillaris* [10]. Соединения хрома вызывали увеличение хроматидных мутаций в костном мозге крыс и в периферической крови человека, при увеличении дозы – достоверно увеличивались геномные мутации [11].

Учет нарушений хромосом в потомстве каждого из изученных деревьев отдельно показал варьирование цитогенетических признаков внутри учетных площадок,

Таблица 3

Относительный вклад разных типов структурных мутаций хромосом в общий массив нарушений, %

№ дерева	Двойные мосты	Одиночные мосты	Отставшие хромосомы	Фрагменты	Микроядра	Кольцевые хромосомы
1 учетная площадка (1-1.5 км)						
95/1	20	26.7	33.3	20	0	0
95/2	6.7	20	13.3	20	26.7	13.3
95/3 в с	18.2	39.4	13.2	2.2	8.9	18.0
	8.3	16.7	33.3	4.2	16.7	20.8
38/1	14.3	21.4	14.3	21.4	21.4	7.1
38/3	0	33.3	66.7	0	0	0
Среднее	12.24	28.13	26.77	9.98	11.8	11.03
2 учетная площадка (5 км)						
28/1	10	65.6	11.1	6.7	3.3	3.3
29/2	13.6	54.3	4.9	12.3	6.2	8.6
28/3 в с	25	56.2	6.2	6.2	0	6.2
	0	30.8	15.4	23.1	15.4	15.4
Среднее	12.5	51.72	9.4	12.08	6.22	8.38
3 учетная площадка (10 км)						
39/1	6.2	43.8	12.5	25	6.2	6.2
39/2	20.8	8.4	8.4	41.6	16.6	4.1
39/3	13.5	25	13.5	21.9	19.8	6.2
Среднее	15.32	21.38	10.68	32.55	14.82	5.18

значительно превосходящее варьирование средних. Одним из факторов, определяющих уровень спонтанных мутаций у хвойных, является возраст деревьев. У старовозрастных деревьев частота мутаций на порядок выше, чем у молодых [12]. Модельные деревья изученной нами выборки относятся к молодым и средневозрастным. Вероятно, поэтому повышения мутабельности с возрастом не установлено. Наблюдаемую изменчивость можно объяснить генетической гетерогенностью и полиморфизмом популяций сосны по признакам устойчивости к химическим загрязнителям и различной мутабельностью генотипов, составляющих популяцию.

В популяциях древесных широко изучается изменчивость дискретных, альтернативных признаков-маркеров генотипа. Одним из таких признаков является окраска семян. Окраска семян у сосны обыкновенной многообразна и носит наследственный характер. Несмотря на то, что интенсивность цвета может меняться в зависимости от погодных условий в период созревания семян, от расположения шишек в кроне дерева и других причин, основные тона окраски семян сохраняются неизменными у отдельных деревьев в течение его индивидуальной жизни. Окраска семян положена в основу выделения цветосеменных рас и изучения их взаимосвязи с другими морфологическими признаками и с условиями произрастания. В частности, установлено, что в условиях Сибири отмечается взаимосвязь окраски с весом ($r=0,6$) и всхожестью семян ($r=0,5$) [13].

В изученных нами выборках семян было выделено пять цветосеменных рас: черные, темно-серые, серые, пестрые и белые. Если всхожесть темных семян не зависела от степени загрязнения участка и оставалась достаточно высокой – 75-100%, то фракции белых семян на самом загрязненном участке имели до 1/3 пустых и недоразвитых семян, а всхожесть их колебалась от 0 до 50%.

Учет цитогенетических нарушений в различных по цвету фракциях семян показал, что количество нарушений, в отличие от всхожести семян, скорее всего, не связано с этим признаком.

Таким образом, изучение цитогенетических показателей сосны обыкновенной из лесного массива с признаками дигрессии, вызванной загрязнением выбросами теплоэлектростанции, показало, что при высоком уровне загрязнения проявляются токсические свойства загрязнителей, а уровень мутирования равен контрольному. При снижении за-

грязнения наблюдаются генетические эффекты – достоверное повышение аберраций хромосом в корневой меристеме проростков. Индивидуальный учет цитологических показателей каждого дерева выявил высокую гетерогенность популяции по признакам устойчивости к химическим загрязнителям и мутабельности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Второва В.Н. Изменчивость содержания элементов-биофитов и тяжелых металлов в растениях лесных экосистем Крайнего Севера в условиях техногенеза // Тяжелые металлы, радионуклиды и элементы-биофиты в окружающей среде. Т. 1.- Семипалатинск, 2002. – С. 26-31.
2. Кац В.Е. Отчет о рекогносцировочных эколого-геохимических исследованиях по Программе геоэкологического мониторинга окружающей среды г. Бийска. – Майма: ГП “Алтай-Гео”. – 1997. – 74 с.
3. Трунов М.И. Современное состояние лесных экосистем зеленой зоны г. Бийска в условиях техногенного загрязнения. Дис. ... к.б.н. – Барнаул, 2002.
4. Гераськин С.А., Зимина Л.М., Дикарев В.Г. и др. Сравнительный анализ методами биоиндикации антропогенного загрязнения района расположения предприятия по переработке и хранению радиоактивных отходов и 30-км зоны ЧАЭС // Экология, 2000. – № 4. – С. 300-303.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988.– 270 с.
6. Геохимия окружающей среды. М.: Недра, 1990. – 335 с.
7. Буланова Н.В., Сынзыныс Б.И., Козьмин Г.В. Алюминий индуцирует аберрации хромосом в клетках корневой меристемы проростков пшеницы // Генетика, 2001. – № 12. – С.1725-1728.
8. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Удалова А.А., Дикарева Н.С. Влияние раздельного действия ионизирующего излучения и солей тяжелых металлов на частоту хромосомных аберраций в листовой меристеме ячменя // Генетика, 1996. – № 2. – С. 272-278.
9. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Удалова А.А., Дикарева Н.С. Влияние комбинированного действия ионизирующего излучения и солей тяжелых металлов на частоту хромосомных аберраций в листовой меристеме ячменя // Генетика, 1996. – № 2. – С. 279-287.
10. Рупошев А.Р., Гарина К.П. Мутагенное действие солей кадмия // Цитология и генетика, 1976. – № 5. – С. 437-439
11. Бигалиев А.Б., Туребаев М.Н., Елемесова М.Ш. Цитогенетическое исследование *in vivo* мутагенных свойств соединений хрома // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. – М.: Наука, 1977. – С. 173-176.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ГОРОДСКИХ ЛЕСАХ
Г. БИЙСКА

12. Сунцов А.В. Спонтанные хромосомные мутации у сосны обыкновенной в Центральной Туве // Известия СО АН СССР сер. Биол. наук, 1982. – Вып. 3. – №15. – С. 55-58.

13. Черепнин В.Л. Изменчивость семян сосны обыкновенной. – Новосибирск, 1980. – 370 с.