

УДК 574.21

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE*)

**А.Н. ХОХ<sup>1</sup>, О.В. ЛОЗИНСКАЯ<sup>1</sup>, С.Б. МЕЛЬНОВ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова,  
г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь

**Введение.** Возрастание воздействия современного общества на окружающую среду приводит к негативным изменениям структуры, продуктивности и функционирования экосистем и биосферы в целом [1].

Особое значение приобретает информация об уровнях загрязнения, характере и интенсивности ответной реакции биологических объектов на влияние токсикантов. Поэтому целесообразным становится поиск биологических индикаторов загрязнения.

Наиболее остро изменения окружающей природной среды отражаются на биотических компонентах, в первую очередь на растительном мире. Поэтому растения могут быть использованы в качестве индикаторов изменений качества среды, так как они находятся на границе двух сред – почвы и воздуха и ведут прикрепленный образ жизни [2,3]. Преимущества методов фитоиндикации состоят также в относительно быстром получении интересующей нас информации.

Поэтому в качестве объекта исследования для выявления мутагенного влияния неорганических загрязнителей (тяжелые металлы) был использован повсеместно распространенный вид клевер луговой (*Trifolium pratense*). Под воздействием антропогенных факторов частота встречаемости специфических фенотипов в популяциях клевера лугового увеличивается и уменьшается при ослаблении действия этих факторов, поэтому он является очень удобным видом для мониторинга объектов окружающей среды, в частности почв, для оценки их мутагенной активности.

Характерной особенностью природных популяций клевера лугового является полиморфизм по форме седого пятна на листовой пластинке. Наследственный полиморфизм, приводящий к фенотипической наследственной изменчивости, – это нормальное, обычное состояние природных популяций, характеризующееся наличием в популяциях разных аллелей и их рекомбинаций. Если количество особей, уклоняющихся от нормы, составляет более 1-2%, то такую изменчивость относят к генетическому полиморфизму [4,5].

Генетический полиморфизм популяций может быть обусловлен действием естественного отбора, который опирается на преимущества гетерозиготных особей или адаптивно перестраивает генетический состав популяций в ответ на изменения экологических факторов.

В популяциях клевера встречаются две группы растений: у одних листья полностью зеленые, у других имеется белое пятно. Пятно на листьях можно охарактеризовать формой и относительным положением пятна на листе [6].

Гистологические исследования показали, что пятна связаны с особой группой палисадных клеток, в которых пластиды или отсутствуют, или присутствуют в меньшей концентрации. Палисадные клетки в районе пятна уменьшены в размере, менее вытянуты, часто неправильной формы, между ними существует большее пространство по сравнению с зелеными участками листа. Сходные пятна встречаются и у других видов клевера [7].

Пятнистость листа наследуется как моногенный признак, а наличие пятна, его разнообразные формы и положение на листе определяется серией множественных аллелей одного гена. Наличие «седого» пятна на листьях – признак доминантный (V), его отсутствие – рецессивный (v). Все аллели гена V нарушают нормальное развитие хлорофилла в палисадных клетках светлой зоны листа, приводят к сокращению в них количества хлоропластов вплоть до их полного отсутствия, способствуют уменьшению размеров палисадных клеток и увеличению пространства между ними, более ранней гибели клеток [8].

В данной работе была предпринята попытка изучить фенотипическое разнообразие у клевера лугового по рисунку «седых» пятен на листьях растений в различных экологических условиях (на

территории и в окрестностях города Бреста), а также выявить взаимосвязи между содержанием тяжелых металлов в почве и наличием некоторых генотипов у клевера лугового.

**Методика и объекты исследования.** Сбор растительного материала проводился в период обильного цветения клевера (июнь-июль). В ходе исследования была охвачена преимущественно промышленная часть города (ул. Я. Купалы, ул. Орджоникидзе, ул. Октябрьской революции, ул. 17 Сентября), точки сбора находились на значительном отдалении друг от друга. Вдоль улиц сбор образцов производился со стороны транспортных магистралей, железнодорожных путей и пешеходных дорожек.

Наблюдения за изменением рисунка на листьях клевера лугового проводились путем подсчета форм с различным рисунком и без него на пробных площадках. Кроме того, осуществлялся расчет частоты встречаемости выявленных фенотипов (в %). Все обнаруженные нами фены сверялись с известными в литературе формами, а при обнаружении новых форм они заносились в таблицу. Отдельно отмечалось наличие растений с какими-либо уникальными фенами, например с рисунком красного цвета, растений-мутантов с 4 и более листьями и т.д.

В ходе исследования было собрано и проанализировано 2000 образцов растений клевера лугового. Статистический анализ результатов проводился с применением пакета программ MS Excel 2007 (вычисление средней ошибки и оценка достоверности различий сопоставляемых показателей).

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования показали, что на изучаемой территории в популяциях клевера встречаются 10 типов фенотипов. Фенотипическое разнообразие листьев клевера больше в городских условиях (10 фенотипов) по сравнению с природными биоценозами. В среднем в пределах элементарных популяций клевера насчитывается от 4 до 8 фенотипов.

Для всех популяций отмечается преобладание фена  $vv$  без рисунка и фена  $V^H V^B$ . Высокой частотой встречаемости характеризуются фены  $VV$ ,  $Vv$ ,  $V^{Bh} V^P$  и  $V^P V^P$ . Реже встречаются фены  $V^H V^H$  и  $V^H V^P$ , а также новые формы фенотипов. В городских условиях для популяций клевера отмечено наличие фенотипов  $V^P v$  и  $V^S V^H$ , не характерных для природных растительных сообществ. Выявлены различия по частоте встречаемости отдельных фенотипов в зависимости от условий произрастания: для антропогенно нарушенных территорий наблюдаются увеличение частоты встречаемости фенотипов  $V^H V^B$ ,  $V^H V^H$ ,  $V^{Bh} V^P$ ,  $V^H V^P$ ,  $V^P V^P$  и уменьшение таковой фена  $vv$  (без рисунка).

Таким образом, популяции клевера лугового в природных биоценозах характеризуются большей морфогенетической однородностью, в городских экосистемах – большим фенетическим полиморфизмом.

В результате исследования были выявлены наиболее часто и наиболее редко встречающиеся рисунки «седого» пятна и определяющие их генотипы, которые отображены на рисунках 1 и 2.

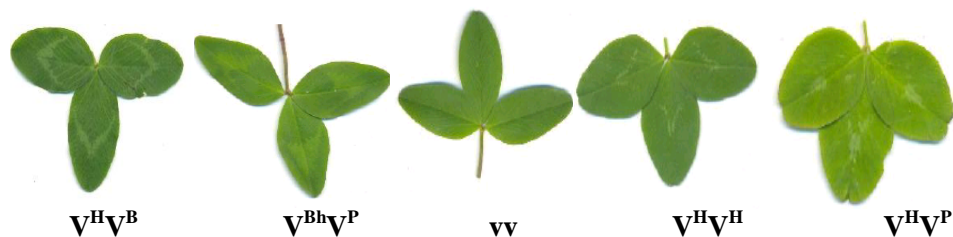


Рисунок 1 – Наиболее часто встречающиеся варианты взаимодействия множественных аллелей гена  $V$ , определяющие рисунок «седого» пятна на листьях *T. pratense*



Рисунок 2 – Редко встречающиеся варианты взаимодействия множественных аллелей гена, определяющие рисунок «седого» пятна на листьях *T. pratense*

На улице Московской и улице 17 Сентября встречались атипичные формы листьев (в виде буквы «М», напоминающие греческую букву «омега», растения с атипичной листовой пластинкой в форме «сердечка», «четырёхлистники»). Это может быть связано с повышенной антропогенной нагрузкой и сильным загрязнением из-за наличия на данных территориях дорог с интенсивным автотранспортным и железнодорожным движением.



**Рисунок 3 – Атипичные формы листовой пластинки *T. pratense* (четырёхлистный клевер)**

Анализируя частоту встречаемости различных генотипов и мест сбора образцов клевера, можно заметить, что генотипы  $vv$ ,  $VV$ ,  $Vv$ ,  $V^Pv$  и  $V^Sv^H$  встречаются чаще в точках с незначительным загрязнением почв тяжелыми металлами, а генотипы  $V^Hv^B$ ,  $V^Hv^H$ ,  $V^{Bh}v^P$ ,  $V^Hv^P$  и  $V^Pv^P$  – в точках, где содержание тяжелых металлов превышает ПДК. Вследствие этого логично провести параллели между процентным соотношением данных генотипов в каждой точке города Бреста со статистикой загрязненности по городу Бресту. Например, на улице Орджоникидзе наблюдается незначительное количество генотипов  $vv$  (32%), что свидетельствует о загрязненности данной зоны, также в данной точке наблюдается преобладание нестабильных генотипов  $V^Hv^B$  (26%) и  $V^{Bh}v^P$  (10%), следовательно, данные по процентному соотношению генотипов и данные по статистике загрязненности по городу Бресту совпадают. В результате этого сравнения можно прийти к выводу, что зависимость степени гетерогенности популяций от уровня загрязнения среды произрастания существует.

Следующий этап работы заключался в определении микроэлементного состава в растительном материале и почве при помощи рентгенофлуоресцентного анализатора CEP-01 с оригинальным программным обеспечением Elvatech MCA Software.

Анализ почв показал повышенное содержание свинца в пробах. Так, в восточной части города доля свинца почти в два раза превышает ПДК, что свидетельствует о значительном загрязнении территории автотранспортом. Кроме того, количество элементов, проявляющих тенденцию к образованию максимальных концентраций для этой территории, относительно других районов города, самое большое и равно восьми, что указывает на наличие здесь многочисленных источников загрязнения.

По данным рентгено-флуоресцентного анализа вегетативных органов клевера были сделаны выводы о том, что внутри растений макро- и микроэлементы распределяются неравномерно. Большинство из них концентрируются в листьях (Zn, Ca) и меньше – в стеблях. Тяжелые металлы накапливаются преимущественно в корнях (Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Sr). В цветках содержится меньшее количество микроэлементов по сравнению с содержанием их в листьях и стеблях. Исключение составляет Cu, которая может концентрироваться не только в вегетативных частях, но и в цветках, но в минимальных количествах. Из минеральных элементов в цветках больше всего содержится Ca, Mg, P, в них не накапливается заметного количества токсичных элементов: Pb, Hg, As, Sn. Содержание кадмия во всех исследованных образцах *T. pratense* имеет практически одинаковое значение. Ti и Si содержатся в очень малом количестве и сосредотачиваются преимущественно в корнях. Распределение макро- и микроэлементов в максимальном и минимальном количестве в различных частях взрослых растений клевера лугового показано в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение макро- и микроэлементов в растениях клевера лугового (*T. pratense*)

Al	B	Ba	Cu	Fe	Mg	Mn	Pb	Si	Ti	Zn
Максимальное значение										
корни	листья	листья	корни	корни	листья	листья	листья	листья корни	корни	листья
Минимальное значение										
стебли	стебли	стебли	листья	стебли	корни	стебли	стебли	стебли	стебли	корни

Для выявления взаимосвязи между содержанием тяжелых металлов в почве и наличием определенных генотипов у клевера лугового были рассчитаны коэффициенты корреляции (табл. 2).

Таблица 2 – Коэффициент корреляции между содержанием тяжелых металлов в почве и некоторыми генотипами клевера лугового

Генотипы	Cu	Fe	Zn	Ni	Pb
Vv	+ 0,06	+ 0,41	+ 0,22	+ 0,14	- 0,03
V <sup>H</sup> V <sup>H</sup>	+ 0,25	+ 0,39	+ 0,37	+0,23	+ 0,06
VV	+ 0,21	+ 0,42	+ 0,34	+ 0,22	+ 0,03
vv	+ 0,36	- 0,03	+ 0,44	- 0,21	+ 0,13
V <sup>Bh</sup> V <sup>P</sup>	- 0,35	+ 0,02	- 0,10	- 0,03	- 0,19

Существует среднего уровня положительная связь, статистически доказуемая с первым порогом вероятности между содержанием цинка и генотипом vv ( $r = +0,44$ ), железа и генотипом VV ( $r = +0,42$ ), железа и генотипом Vv ( $r = +0,41$ ). Была отмечена средняя положительная связь между генотипом V<sup>H</sup>V<sup>H</sup> и содержанием железа ( $r = +0,39$ ); V<sup>H</sup>V<sup>H</sup> и содержанием цинка ( $r = +0,37$ ); генотипом V<sup>H</sup>V<sup>H</sup> и содержанием меди ( $r = +0,36$ ); VV и содержанием цинка ( $r = +0,34$ ). Установлена среднего уровня отрицательная связь между содержанием меди и генотипом V<sup>Bh</sup>V<sup>P</sup> ( $r = -0,35$ ). В этих случаях достоверность коэффициента корреляции статистически не подтвердилась. Для установления достоверности корреляционной связи необходим больший объем выборки (число коррелируемых пар).

Корреляционный анализ данных по содержанию металлов в растениях и почвах показал наличие значимой положительной зависимости между содержанием Zn, Pb, Cd, K и Ca в растениях и содержанием этих элементов в почве (табл. 3). Между содержанием Zn, Pb и Cd в растении и содержанием в почве K и Ca обнаружена значимая отрицательная связь. Следовательно, повышенное содержание K в почве также как и Ca оказывает ингибирующее влияние на транслокацию в растения некоторых металлов и, что особенно важно, опасных токсикантов – Pb и Cd. Поэтому повышенное содержание K в среде приводит к снижению коэффициентов накопления Cu, Zn и Cd, а также к снижению поступления Pb в растения [9].

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции между содержанием элементов в клевере луговом и концентрацией их в почве

		Содержание элементов в почве						
		Cu	Fe	Zn	Pb	Cd	K	Ca
Содержание элементов в растениях	Cu	0,03	-0,31	-0,16	-0,05	0,01	0,10	0,18
	Fe	-0,05	-0,09	-0,18	0,04	-0,19	0,01	0,14
	Zn	0,03	0,29	0,24	0,37	0,08	-0,40	-0,40
	Pb	-0,21	0,37	0,33	0,63	0,12	-0,68	-0,61
	Cd	-0,31	0,11	0,43	0,32	0,71	-0,37	-0,53
	K	-0,003	-0,21	-0,28	-0,46	-0,14	0,40	0,47
	Ca	0,18	-0,27	-0,19	-0,18	-0,15	0,22	0,32

### **Выводы:**

1. Для всех популяций отмечается преобладание фена vv без рисунка и фена  $V^H V^B$ . Высокой частотой встречаемости характеризуются фены VV, Vv,  $V^{Bh} V^P$  и  $V^P V^P$ . Реже встречаются фены  $V^H V^H$  и  $V^H V^P$ , а также фены  $V^P V$  и  $V^S V^H$ . Редки атипичные формы листьев (их количество возрастает с увеличением антропогенной нагрузки). Выявлены различия по частоте встречаемости отдельных фенотипов в зависимости от условий произрастания: для антропогенно нарушенных территорий наблюдаются увеличение частоты встречаемости фенотипов  $V^H V^B$ ,  $V^H V^H$ ,  $V^{Bh} V^P$ ,  $V^H V^P$ ,  $V^P V^P$  и уменьшение таковой фена vv (без рисунка).

2. Загрязнение различных районов города Бреста характеризуется гетерогенностью распределения макро- и микроэлементов. Содержание основных элементов как в почве, так и в клевере варьирует в широких пределах (от их полного отсутствия до значительного превышения нормы). Например, содержание соединений цинка в биомассе листьев варьирует от 47,85 до 262,91 мкг/г, свинца – от 0,12 до 23,17 мкг/г). Наиболее неблагоприятной экологической ситуацией характеризуется восточный район города Бреста, что обусловлено высоким уровнем загрязнения природных компонентов промышленностью и автотранспортом.

3. Аккумуляция макро- и микроэлементов в растениях и их органах происходит неодинаково. Одни металлы в зависимости от их природы и подвижности в большей степени аккумулируются в листьях (Zn, Ca), другие – в корнях (Cr, Cu, Pb). В стеблях и цветках накопление исследованных макро- и микроэлементов минимально. Существует взаимосвязь между содержанием тяжелых металлов в почве и наличием некоторых генотипов у клевера лугового.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Назаров, А.В. Формирование растительности на экспериментальных нефтезагрязненных площадках / А.В. Назаров, С.А. Иларионов, Э.А. Азизова ; под ред. А.В. Назарова. – Пермь: Вестник Пермского университета, 2000. – 84 с.
2. Моисеев, Н.Н. Экология и образование / Н.Н. Моисеев. – Москва : ЮНИСАМ, 1996. – 24 с.
3. Иерусалимский, Г.Н. Основы биомониторинга / Г.Н. Иерусалимский. – Новосибирск : СГТ, 2001. – 359 с.
4. Орлинский, Д.Б. Эколого-генетическая изменчивость клевера лугового (*Trifolium pratense*) в природных популяциях Среднего Приобья / Д.Б. Орлинский. – Москва : Экология, 1995. – 5 с.
5. Chumashkaev, A.N. Population structure of red clover (*Trifolium pratense*) in Western Siberia / A.N. Chumashkaev. – СПб : Вентана-Граф, 2004. – 34 с.
6. Шварцман, П.Я. Полевая практика по генетике с основами селекции / П.Я. Шварцман. – Москва : Просвещение, 1988. – 111 с.
7. Ашихмина, Т.Я. Экологический мониторинг : учебно-методическое пособие / Т.Я. Ашихмина. – Москва : Академический Проект, 2005. – 416 с.
8. Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals / D.M. Antosiewicz // Biol. Plant. – 2000. – № 4. – P. 599–601.
9. Ваганов, П.А. Экологический риск : учеб. пособие / П.А. Ваганов. – СПб : Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2002. – 146 с.

## **ENVIRONMENTAL QUALITY ASSESSMENT USING OF MEADOW CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE*)**

**A.N. KHOKH, O.V. LOZINSKAYA, S.B. MELNOV**

### **Summary**

The purpose of this study was assessment of quality of environment in different parts of the city of Brest with a different intensity of road transport and industrial action by plant test systems. The paper analyzes phenotypic polymorphism of red clover, as well as qualitative and quantitative analysis of trace elements and heavy metals content in leaves and soil. Distinctions on a population heterogeneity degree and frequency of an «unmarked» phenotype occurrence at different levels of anthropogenous influence are revealed.

© Хох А.Н., Лозинская О.В., Мельнов С.Б.  
Поступила в редакцию 10 октября 2011г.