

## ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ВИДОВ ХВОЙНЫХ В ЗОНАХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ

Проведена диагностика состояния хвойных насаждений на урбанизированных территориях и в местах падения остаточных частей ракетноносителей, запускаемых с космодрома Байконур (Республика Алтай). Выявлены морфологические и анатомические изменения хвои, содержание пластидных пигментов и их соотношение. Для биоиндикации воздушных загрязнителей применен метод регистрации замедленной флуоресценции хлорофилла.

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris*; *Pinus sibirica*; *Picea obovata*; *Abies sibirica*; *Larix sibirica*; Республика Алтай; техногенное загрязнение; анатомия; морфология; флуоресценции хлорофилла.

В настоящее время разработана концепция комплексного экологического мониторинга природной среды, составной частью которого должен быть биологический мониторинг. Он определяется рядом обстоятельств. Во-первых, в изменение физических и химических параметров загрязненности природной среды более трудоемко по сравнению с методами биоиндикации. Во-вторых, в окружающей среде нередко присутствует не один, а несколько токсических компонентов, которые в комплексе воздействуют на живые организмы куда сильнее, чем каждый в отдельности. Синергизм не учитывается физико-химическими методами, однако он выявляется при использовании биоиндикации. Биологический мониторинг позволяет наиболее точно прогнозировать изменения в экологической обстановке. Важный элемент его – растения [1].

Наиболее удобными биоиндикаторами атмосферного загрязнения среды являются хвойные деревья, т.к. они отличаются высокой чувствительностью к повышенным концентрациям токсических веществ в окружающей среде, а также возможностью проведения исследований в течение всего года.

Целью наших исследований является выявление изменений в состоянии растений на ранних этапах, когда еще нет видимых повреждений, указывающих на их необратимый характер. Сведения о структурно-функциональных нарушениях, характере поступления, превращения и аккумуляции токсикантов в органах растений в техногенной среде можно получить с использованием различных методов (анатомических, физиологических, биохимических и т.д.). Функциональные отклонения фиксируются раньше, чем структурные. Морфологические признаки (хлорозы, некрозы, дефолиация) влияния среды появляются еще позже.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны виды хвойных, произрастающие на территории Республики Алтай: сосна обыкновенная – *Pinus sylvestris* L., сосна сибирская – *Pinus sibirica* Du Roi, ель сибирская – *Picea obovata* Ledeb., пихта сибирская – *Abies sibirica* Ledeb., лиственница сибирская – *Larix sibirica* L.

Пробные площади (контроль) находились в 20–30 км от города. Опытные площади расположены в загрязненном районе г. Горно-Алтайска (урбанизированная территория) и в Усть-Канском районе (места падения остаточных частей ракетноносителей – ОЧРН).

Контрольные и опытные (загрязненные) площади находились в близких природно-климатических усло-

виях. На каждой пробной площади были выбраны визуально неповрежденные деревья, находящиеся в одинаковых условиях освещения и увлажнения. Для анатомических и физиологических исследований отбиралась однолетняя хвоя без видимых повреждений. Возраст древесных пород составлял 40–55 лет.

Для измерения флуоресценции хлорофилла сбор побегов со всех исследуемых площадей осуществлялся в зимнее время в течение одного дня из средней части кроны южной экспозиции. Для выведения из состояния зимнего покоя срезанные побеги помещались в специально оборудованный бокс с искусственным равномерным освещением и постоянной влажностью. Для измерения флуоресценции использовалась средняя часть хвоинки, а также феллодерма со стеблей текущего года лиственницы.

Для оценки глубины зимнего покоя и динамики выхода из этого состояния проводилась регистрация термоиндуцированных изменений нулевого уровня флуоресценции хлорофилла (ТИНУФ) листьев (хвои) и феллодермы исследуемых видов на флуориметре «Фотон-5», разработанном в Красноярском государственном университете (КрасГУ). Нагрев производился в диапазоне от 20 до 75°C при средней скорости 5 град/мин. Сравнительную оценку глубины покоя растений из разных мест произрастания проводили по величине соотношению интенсивностей флуоресценции в двух температурных максимумах – при 50 и 70°C – коэффициент К [2].

Регистрацию миллисекундной замедленной флуоресценции (ЗФ) проводили на компьютеризированном флуориметре «Фотон-7-1», также разработанном в КрасГУ. ЗФ возбуждали светом высокой (120 Вт/м<sup>2</sup>) и низкой (10 Вт/м<sup>2</sup>) интенсивностей видимого света.

Для получения дополнительной информации о состоянии растений в различных условиях среды был использован метод гипертермии [3]. Для этого побеги помещались на 5 мин в специально оборудованный термостат при 100% влажности, в котором поддерживалась температура 50±2°C. После этого растения охлаждались на воздухе до комнатной температуры и у них регистрировались изменения величины ОП ЗФ по отношению к ее уровню до прогрева.

Все лабораторные исследования флуоресценции хлорофилла проведены на кафедре экотоксикологии и микробиологии Красноярского государственного университета.

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в 80-процентном ацетоновом экстракте с последующими расчетами по уравнениям [4].

## Результаты и обсуждение

Одним из широко распространенных методов фитоиндикации является морфологический анализ растений. В загрязненных районах города на хвое всех исследованных растений существуют однотипные повреждения. Присутствуют хлорозы (осветленные участки ткани, образование которых связано с нарушением пластидного аппарата и биосинтеза хлорофилла), феофитиновые пятна, некрозы, ранняя дефолиация. По форме повреждения бывают точечными, пятнистыми, сплошными.

Длина хвои сосны заметно варьирует в зависимости от индивидуальных особенностей того или иного дере-

ва [5]. В целом изменчивость хвойных видов по данному признаку мало изучена [6]. Изменения размеров хвои сосны в большой мере неспецифичны [7]. Так, под действием нитрата хвоя удлиняется, а под действием  $SO_2$  – укорачивается. Соединения серы отрицательно влияют на размеры хвои и листовых пластинок [3, 8–10] из-за торможения стадии растяжения клеток [11]. А в зоне действия азотсодержащих соединений размеры и масса хвоинок может увеличиваться, а в отдельных случаях наблюдается даже гигантизм [12].

Наши наблюдения показывают, что значительно снижены ростовые процессы побегов хвойных пород, подвергающихся действию атмосферного загрязнения (рис. 1).

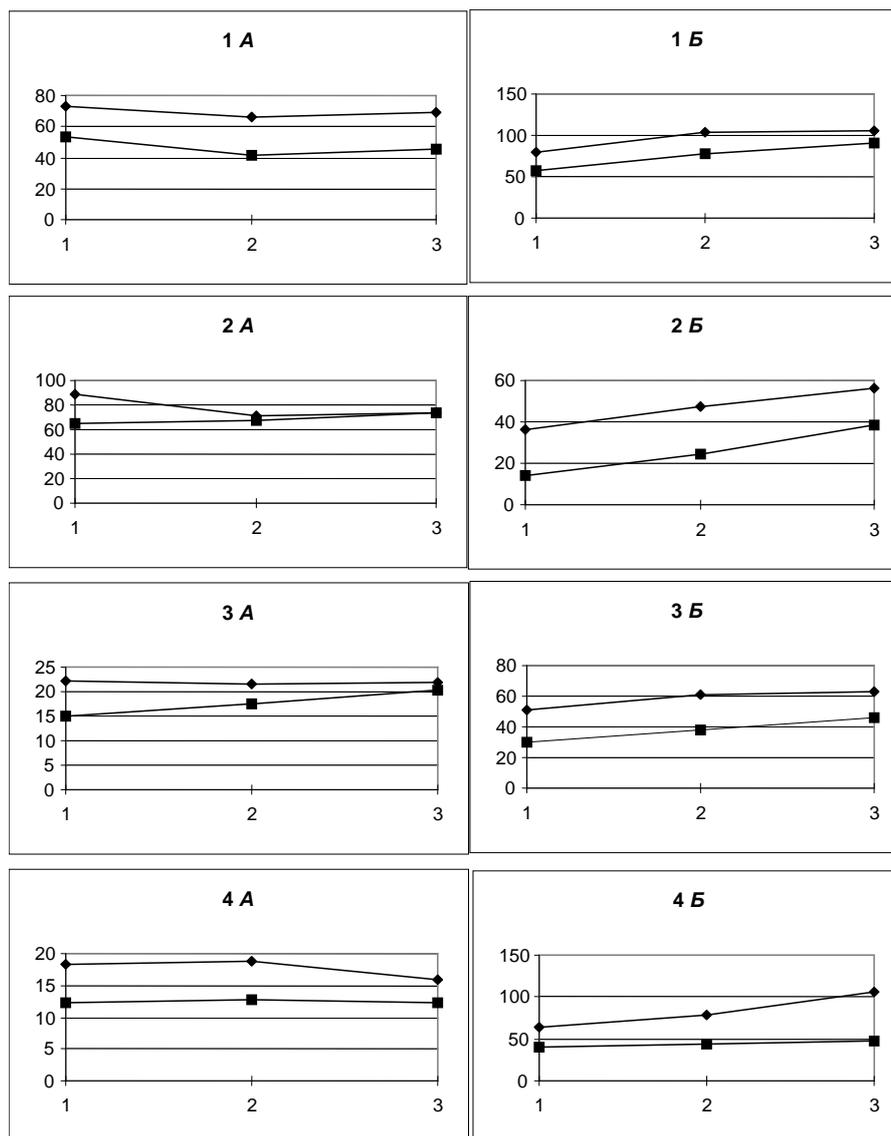


Рис. 1. Длина хвои (А) и стебля (Б) сосны обыкновенной (1), сосны сибирской (2), пихты сибирской (3), ели сибирской (4): —◆— — контроль; —■— — опыт. Ось абсцисс – годы наблюдения, ось ординат – размеры в мм

При этом проявляются видовые и возрастные особенности нарастания хвои и стебля. Например, у сосны обыкновенной хвоя первого года как в контроле, так и в опыте более длинная, по сравнению с двух- и трехлетней. У сосны сибирской молодая хвоя длиннее в контроле, а в опыте, напротив, короче. У пихты и сосны в контроле и опыте

показатели длины трехлетней хвои менее отличаются, чем у однолетней. Разновозрастная хвоя ели в разных вариантах мало отличается. Стебель ежегодно прирастает в длину и ширину, но значительно меньше в условиях загрязнения атмосферы. Полученные результаты согласуются и с результатами других исследователей [9, 11, 13 и др.].

Анатомические исследования позволяют понять механизмы проникновения поллютантов во внутренние ткани органов (лист, стебель), степень и особенности их воздействия. Вблизи котельных хвоя густо покрыта крупнодисперсными веществами (пыль, зола, сажа), которые проникают в мезофилл, прежде всего через устьица и разрыхленный слой кутикулы, а также между клетками эпидермы и гиподермы.

В качестве структурных показателей для индикации атмосферного загрязнения нами выбраны размеры кутикулы, эпидермы, гиподермы, эндодермы, смоляных каналов, жилки (табл. 1).

Таблица 1

**Анатомические показатели хвои некоторых видов, произрастающих в городской среде, % к контролю**

Показатель	Виды				
	Ель сибирская	Сосна обыкновенная	Сосна сибирская	Пихта сибирская	Лиственница сибирская
Кутикула	142	100	78	82	75
Эпидерма	105	100	112	89	94
Гиподерма	100	73	56	–	74
Эндодерма	104	94	104	96	86
Смоляной ход	71	64	80	78	125
Жилка	100	260	106	81	86

Данные, представленные в табл. 1, указывают на снижение практически всех структурных показателей у пихты и лиственницы. У ели толщина кутикулы увеличивается в городских условиях на 42%, а диаметр смоляного хода уменьшается на 29%. Остальные показатели мало отличаются от контрольных. У видов рода сосна наблюдается большее варьирование структурных параметров.

Деструктивный характер изменений связан с прямым контактом живых тканей с химическими веществами разного происхождения и механическими ингредиентами (пыль, зола, сажа). Пыль нарушает температурный и водный режим растений, поглощение световой энергии и газообмен [14, 15]. Вследствие такого взаимодействия происходит нарушение целостности клеток и тканей, что приводит к появлению различных морфологических изменений (хлорозы, некрозы и т.д.).

У всех исследованных видов наблюдается деструкция кутикулы, эпидермы и гиподермы. Хвоя в этих местах покрыта плотным слоем пыли, сажи, который забивает устьица. Как известно, представляя собой защитный покров, кутикула вместе с тем довольно легко проницаема для ряда веществ, в том числе для газов и воды. Поражение листьев и хвои атмосферными загрязнителями обусловлены в большей степени кутикулярной проницаемостью, чем численностью открытых устьиц [16]. Это положение может быть подкреплено и нашими экспериментальными данными. Кроме уменьшения толщины кутикулы в загрязненных районах, она часто становится волнистой, извилистой, рассеченной и даже прерывистой, что еще более облегчает проникновение токсических веществ во внутренние ткани хвои. Зимняя хвоя имела более разрушенную кутикулу, чем осенняя.

Количество и расположение смоляных ходов в хвое сосны изменчивы [5, 17, 18]. Литературные сведения показывают, что в условиях города у хвойных видов

наблюдается достоверное увеличение количества смоляных каналов на поперечных срезах хвои [15, 19]. Это является неспецифической реакцией хвойных на действие различных неблагоприятных факторов – механических повреждений, физических и химических воздействий [15]. У исследованных видов, кроме лиственницы, в загрязненных районах происходит уменьшение площади смоляных ходов. Наибольшее различие данного параметра по мере увеличения напряженности городской среды отмечено у пихты. Величина этого показателя понижается почти в 2 раза, т.е. при произрастании пихты в городской среде резко уменьшается объем смоляной системы хвои. Сильно воздействуют токсиканты и на смоляные ходы ели. В местах с сильным загрязнением атмосферы они бывают более короткими. Поэтому в средней части хвои ели вместо двух можно обнаружить только один или их полное отсутствие. Стрессы могут вызывать общую гипертрофию эпителиальной ткани смоляных каналов с грануляцией трансфузионной и мезофильной паренхимы [20].

Особенно сильному воздействию подвергаются замыкающие клетки устьиц и близлежащие клетки мезофилла. Клеточная дезорганизация и разрыв клеточных стенок сопровождаются расширением межклеточного пространства. У сосны обыкновенной диаметр жилки увеличивается в 1,6 раза в зоне загрязнения атмосферы, что может способствовать усилению транспорта веществ по проводящим тканям. У остальных видов этот показатель мало отличается.

Эндодерма выполняет функцию пограничной ткани между внутренней и периферической частями хвои. Она отвечает за избирательный транспорт веществ в проводящих пучках. Механические ингредиенты в значительной степени оказывают влияние на процессы фотосинтеза и транспирации, что в конечном итоге изменяет весь ход метаболизма в хвое. По многим анатомическим показателям в местах действия токсикантов прослеживается увеличение коэффициента вариации – С%. Так, варьирование кутикулы в 1,5–2,43 раза, эпидермы в 1,15–2,04 раза выше, чем в контроле.

Сравнительный анализ анатомического строения однолетних стеблей показал, что у хвойных видов в опыте значительно увеличиваются размеры перидермы. Можно полагать, это связано с усилением защитных функций этой ткани. Как правило, на однолетних срезах резко уменьшается диаметр сердцевинки в стебле ели в 1,5 раза, у пихты в 2 раза. По-видимому, это связано с тем, что под влиянием атмосферных токсикантов снижается синтез органических веществ и их мало откладывается в сердцевинной запасающей паренхиме. Поллютанты оказывают влияние на образование древесины – в контрольных образцах она более мощная.

Сравнительное определение содержания зеленых и желтых пигментов в однолетней хвое некоторых древесных растений (табл. 2) проводили в загрязненном районе г. Горно-Алтайска и чистой территории.

Согласно полученным данным, видовой принадлежность определяет количественный уровень пигментов, содержащихся в хвое. Наиболее высокое содержание хлорофиллов и каротиноидов отмечено в хвое пихты сибирской и ели сибирской как в контроле, так и в опыте. Сосна обыкновенная и сосна сибирская накап-

ливают несколько меньшее количество исследованных пигментов. В условиях опыта количество хлорофилла *a* и *b* уменьшается на 14–32%.

Таблица 2

Содержание пигментов и их соотношение в двухлетней хвое в условиях городской среды, % к контролю

Вид	Сезон	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Каротиноиды
Ель сибирская	Лето	84	74	100
	Зима	69	68	78
Сосна обыкновенная	Лето	80	68	92
Сосна сибирская	Лето	86	85	81
Пихта сибирская	Лето	96	82	88
	Зима	59	58	65

По содержанию зеленых пигментов видно, что антропогенная нагрузка сказывается более существенно на хвое сосны обыкновенной и ели сибирской. Вместе с тем в летний период отношение хлорофиллов *a/b* не выходит за норму (2–2,3), поэтому можно полагать, что фотосинтетический аппарат поражается незначительно и может устойчиво работать. Видоспецифичность при действии воздушных загрязнений проявлялась также и в изменении желтых пигментов, особенно у пихты и сосны сибирской, у которых изменения в содержании зеленых пигментов были выражены в меньшей степени. Исследование пигментного фонда древесных пород в городской среде в зимнее время (усиливается антропогенная нагрузка от работы многочисленных котельных) показало, что содержание зеленых и желтых пигментов уменьшается в большей степени, чем в летний период.

Одним из оперативных методов, позволяющих интегрально и быстро оценивать изменения в структурно-функциональном состоянии фотоассимиляционного аппарата растений, является измерение флуоресценции хлорофилла [21–23]. Глубину покоя сосны обыкновенной, ели сибирской из загрязненных районов оценивали по величине отношения (коэффициент *K*) низкотемпературного (50°C) и высокотемпературного (70°C) максимумов на температурных кривых флуоресценции хвои исследуемых видов. Полученные данные показали, что растения из загрязненных районов позже, чем из чистых мест произрастания, уходят в покой и значительно быстрее выходят из состояния зимнего покоя. Такие растения больше подвергаются воздействию суровых зимних условий.

Для выявления возможных повреждений фотосинтетического аппарата у видов, подверженных слабому хроническому загрязнению, нами был использован метод дополнительного стрессового воздействия. Растения, произрастающие в условиях умеренного загрязнения, благодаря высокой адаптационной способности растительных организмов обычно не имеют видимых повреждений не только на уровне органов или тканей, но и на уровне клетки [24]. Применение стрессора, оказывающего дополнительную нагрузку на компенсаторную систему клетки, помогает выявить скрытые повреждения [25], что обеспечивает более раннюю диагностику ее состояния [21, 26]. Одним из наиболее удобных и легко нормируемых стресс-факторов является нагревание хвои до температур, превышающих физиологический оптимум фотосинтеза, но не вызывающих необратимых изменений фотосинтетического аппарата [20].

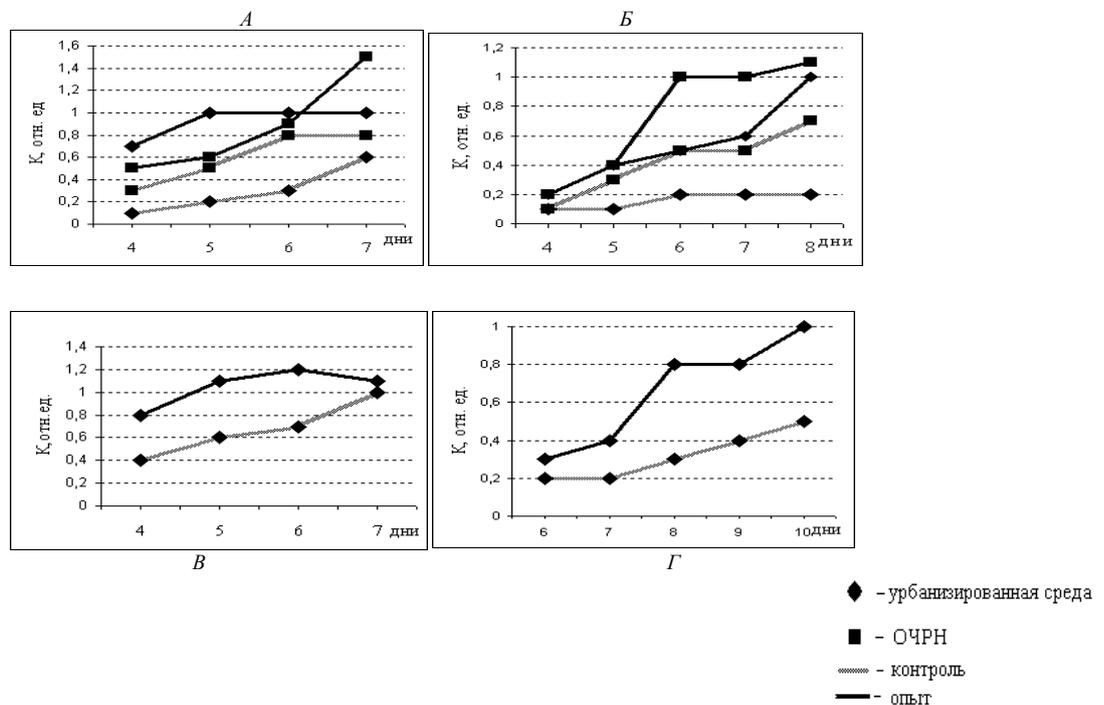


Рис. 2. Динамика изменений показателя *K* при выведении из состояния зимнего покоя видов хвойных, произрастающих в различных по загрязненности районах: А – ель сибирская; Б – сосна обыкновенная; В – пихта сибирская; Г – лиственница сибирская (ОЧРН – места падения остаточных частей ракетоносителей)

В качестве показателя замедленной флуоресценции было взято отношение значений замедленной флуоресценции, возбуждаемой светом высокой и низкой интенсивности – относительный параметр замедленной флуоресценции (ОП ЗФ). Выбранные световые условия обеспечивают регистрацию, соответственно, быстрой и мед-

ленной компонент затухания замедленной флуоресценции. Повышение величины ОП ЗФ свидетельствует об активации фотосинтетической функции растительного объекта [27]. Регистрация ЗФ проводилась на девятые сутки после сбора растения и искусственного их выведения из состояния зимнего покоя (рис. 3).

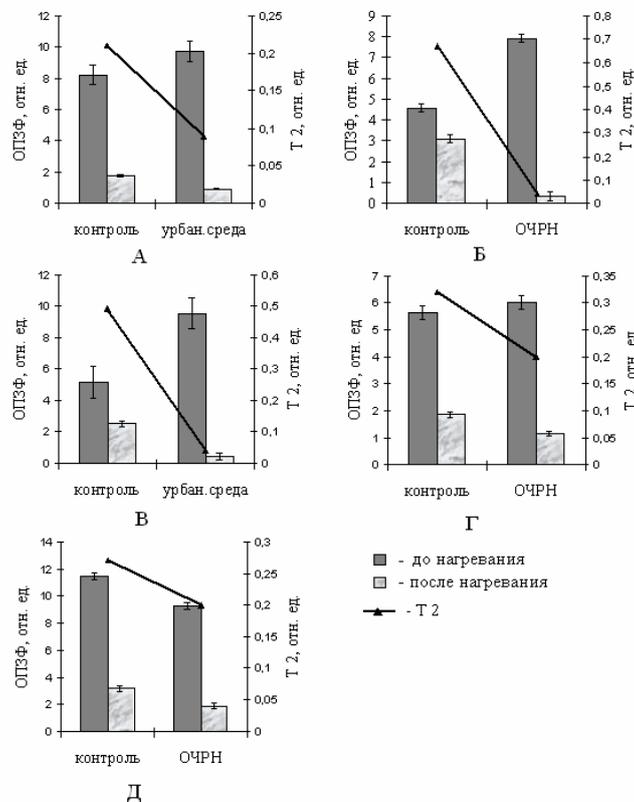


Рис. 3. Значения относительного показателя замедленной флуоресценции (ОП ЗФ) хлорофилла до и после теплового воздействия и коэффициента теплоустойчивости (Т<sub>2</sub>) хвои ели сибирской (А, Б), сосны обыкновенной (В, Г) и пихты сибирской (Д). Сбор образцов производился в феврале (урбан. среда – урбанизированная среда, ОЧРН – места падения остаточных частей ракетносителей)

Исследования показали, что при дополнительном стрессовом воздействии хвои у изученных видов растений из загрязненного района сильнее подвержена действию повышенных температур, чем хвои из чистого района.

Для оценки теплоустойчивости хвои использовались значения коэффициента Т<sub>2</sub>, являющегося отношением величины ОП ЗФ хвои после теплового воздействия к таковому до ее прогрева [3]. Как видно на рис. 3, теплоустойчивость хвои из районов с повышенной антропогенной нагрузкой снижается. Особенно это проявляется у ели в местах падения оста-

точных частей ракетносителей и у сосны на урбанизированной территории.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что у всех изученных видов растений используются методы (анатомические, физиологические) дают возможность надежно выявлять антропогенные воздействия, связанные с загрязнением мест их произрастания задолго до появления морфологических изменений. Это позволяет рекомендовать данные методические приемы и виды растений для биоиндикации уровня загрязнения среды в исследуемом регионе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонов В.И. Растения и чистота природной среды. М.: Наука, 1986. 172 с.
2. Гаевский Н.А., Сорокина Г.А., Гехман А.В., Фомин С.А., Гольд В.М. Способ определения степени глубины покоя древесных растений. Авторское свидетельство № 1358843 от 15 августа 1987 г.
3. Пахарькова Н.В. Замедленная флуоресценция хлорофилла хвойных в условиях техногенного загрязнения атмосферы. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 1999. 22 с.
4. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии / Под ред. О.А. Павлиновой. М.: Наука, 1971. С. 154–170.
5. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. М.: Наука, 1964. 191 с.
6. Мамаев С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений. М.: Наука, 1972. 283 с.
7. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. М.: Мир, 1988. 348 с.
8. Рябинин В.М. Влияние промышленных газов на рост деревьев и кустарников // Ботанический журнал. 1962. Т. 47, вып. 3. С. 412–416.
9. Сергейчик С.А. Древесные растения и оптимизация промышленной среды. М.: Наука и техника, 1984. 168 с.

10. *Пастернак П.С., Ворон В.П., Стельмахова Т.Ф.* Воздействие загрязнения атмосферы на сосновые леса Донбасса // Лесоведение. 1993. № 2. С. 28–38.
11. *Алексеев В.А., Лянгузова И.В.* Влияние загрязнения на изменение морфоструктуры деревьев // Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. Л.: Наука, 1990. С. 87–94.
12. *Аугустайтис А.А.* Особенности формирования надземной фитомассы сосновых молодняков в условиях загрязнения природной среды // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Л.: Гидрометеоздат, 1989. Т. 12. С. 32–51.
13. *Николаевский В.С.* Экологическая оценка загрязнения среды и состояния наземных экосистем методами фитоиндикации. М.: МГУЛ, 1998. 191 с.
14. *Ершов М.Ф.* О фотосинтезе чистых и запыленных листьев липы мелколистной и вяза мелколистного // Докл. АН СССР. 1957. Т. 112, № 6. С. 78–82.
15. *Илькун Г.М.* Загрязненность атмосферы и растения. Киев: Наукова думка, 1978. 247 с.
16. *Кравкина И.М.* Влияние атмосферных загрязнителей на структуру листа // Ботанический журнал. 1991. Т. 76, № 1. С. 3–9.
17. *Эсау К.* Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 564 с.
18. *Мамаев С.А.* Виды хвойных на Урале и их использование в озеленении. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983. 112 с.
19. *Куровская Л.В.* Морфофункциональные особенности хвойных растений в условиях городской среды (на примере г. Томска): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2002. 22 с.
20. *Трешоу М.* Диагностика влияния загрязнения воздуха и сходство симптомов // Загрязнение воздуха и жизнь растений. Л.: Гидрометеоздат, 1988. С. 126–144.
21. *Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Рубин А.В.* Замедленная флуоресценция и ее использование для оценки состояния растительного организма // Известия АН СССР. 1985. Сер. биол. № 4. С. 9–13.
22. *Гаевский Н.А., Моргун В.Н.* Использование переменной и замедленной флуоресценции хлорофилла для изучения фотосинтеза растений // Физиология растений. 1993. Т. 40, № 4. С. 589–595.
23. *Григорьев Ю.С., Бучельников М.А.* Биоиндикация загрязнений воздушной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла листьев и феллодермы деревьев // Экология. 1999. № 4. С. 303–305.
24. *Веселовский В.А., Веселова Т.В.* Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. М.: Наука, 1990. 220 с.
25. *Хуттунен С.* Зависимость заболеваемости и других стрессовых факторов от загрязнения атмосферы // Загрязнение воздуха и жизнь растений. Л.: Гидрометеоздат, 1988. С. 357–391.
26. *Фарафонов М.Г.* Биоиндикационные свойства хлорофилла в условиях воздействия загрязнителей неопределенного состава // Экология. 1991. № 2. С. 76–78.
27. *Григорьев Ю.С., Фуряев Е.А., Андреев А.А.* Способ определения содержания фитотоксических веществ // Патент № 2069851. Бюл. изобр. 1996. № 33 от 27.11.96.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 22 мая 2009 г.