

УДК 574.476: 581.524.1

## К ОЦЕНКЕ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКОЙ И ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИСТОВОГО ОПАДА НЕКОТОРЫХ ДРЕВЕСНЫХ ИНТРОДУЦЕНТОВ

А. В. Зотов, Е. А. Кудрявцева, Л. М. Кавеленова

Представлены результаты оценки с помощью биотестов различных составляющих аллелопатической активности (водорастворимых, летучих выделений, миазминов, сапролинов) листового опада пяти видов древесных растений-интродуцентов из дендрария ботанического сада Самарского государственного университета. Для данных проб опада выполнена также оценка генотоксичности с помощью *Allium*-теста. Все изученные образцы опада вызвали значительное ингибирование биотестов, в разной степени стимулировали появление клеток с хромосомными aberrациями (мостами) и повышение митотического индекса в меристеме корней лука.

Листовой опад – важная форма мортмассы, ежегодно образующаяся в листопадных лесах умеренных широт, влияющая на развитие различных участников лесных экосистем. Оказавшись на поверхности почвы, опад поэтапно разлагается под воздействием беспозвоночных, грибов, актиномицетов, бактерий. Опад является источником значительного количества биологически активных веществ, которые поступают в почву и участвуют в аллелопатических взаимодействиях между растениями [1]. Возможно вторичное появление биологически активных соединений в ходе переработки опада организмами-редуцентами [2]. Эти соединения могут воздействовать на фауну и микрофлору почв. Водорастворимые и летучие выделения из «свежего» и трансформированного редуцентами опада могут угнетать или стимулировать развитие растений. Они

также благоприятствуют или препятствуют развитию определенных видов микроорганизмов, которые сами могут прямо или косвенно влиять на скорость разложения опада. Листовой опад содержит определенное количество зольных веществ, которые при его минерализации поступают в почвенную среду, откуда повторно могут быть извлечены корнями растений. На поверхности опада присутствуют разнообразные микроорганизмы, в том числе фитопатогены [3].

Кратко остановимся на составляющих аллелопатической активности растительного организма. Все выделения растений А. М. Гродзинский предложил делить на прижизненные и посмертные, происходящие в результате отмирания организма или его отдельных частей [4]. Прижизненные выделения, в свою очередь, можно разделить на активные, обусловленные нормальной жизнедеятельностью, и пассивные, происходящие, например, в результате вымывания веществ из листьев осадками и пр. По способу отчуждения в окружающую среду они могут быть летучими и водорастворимыми.

Летучие выделения растений можно разделить на три типа: фитогенные, фитонциды и миазмины. Фитогенные выделения – активные, отчасти пассивные выделения неповрежденных органов растений; фитонциды – выделения поврежденных тканей, возникающие вследствие нарушения целостности мембраны веществ и автолиза. В состав летучих соединений, получивших общее название фитонциды, входят эфирные

---

© Зотов Александр Владимирович  
(biotest@samsu.ru),  
магистрант биологического факультета  
Самарского государственного университета.  
Кудрявцева Екатерина Александровна  
(sambg@samsu.ru),  
биолог ботанического сада  
Самарского государственного университета,  
443086, Россия, г. Самара, Московское шоссе, 36.  
Кавеленова Людмила Михайловна  
(biotest@samsu.ru),  
заведующая кафедрой экологии,  
ботаники и охраны природы  
Самарского государственного университета,  
443011, Россия, г. Самара, ул. Академика Павлова, 1.

масла, альдегиды уксусной и пропионовой кислот, метиловый и этиловый спирты, полифенолы и другие соединения. Фитонциды, как правило, представляют собой смесь различных веществ. Биологическая активность фитонцидов чаще всего обусловлена не одним каким-то веществом, а всей совокупностью веществ. Миазмины представляют собой выделения из отмерших, гниющих тканей.

Водорастворимые выделения также классифицируются на три группы: активные (экссудаты), пассивные (диффузаты), смертные (сапролины, от греч. «sargos» – гнилой) [4].

Сумма всех выделений живых и мертвых организмов и отдельных их частей составляет так называемый аллелопатический потенциал. Большое значение в аллелопатии принадлежит идентификации аллелопатически активных веществ, которые иногда бывает трудно установить, поскольку в естественных условиях они находятся в связанном состоянии и именно в таком виде являются физиологически активными, однако при помощи биопроб их достаточно легко обнаружить [4, 5]. Среди выделений из листового опада присутствуют все перечисленные виды, за исключением экссудатов и фитогенных (фитонцидов). Проводя интродукционные исследования, необходимо всесторонне оценивать поведение видов-интродуцентов с учетом возможности их введения в культуру и выхода в природные экосистемы нового региона. При этом необходима и экспериментальная проверка активности листового опада, образуемого интродуцентами [6]. Однако если аллелопатическая активность выделений листового опада давно изучается [1, 3–6], то сведений об их генотоксической активности крайне мало. Для интродуцируемых в Самарской области растений подобные данные представляются нами впервые.

Среди факторов негативного влияния различных веществ на организмы мутагенные и генотоксические эффекты заслуживают особого внимания, поскольку происходящие в данном случае генетические повреждения способны вызывать нарушения здоровья у настоящего и будущих поколений организмов [7]. Необходимость выявления соединений, взаимодействующих с дезокси-

рибонуклеиновой кислотой (ДНК), исключительно важна для оценки качества окружающей среды, присутствия в ней соединений с мутагенной и канцерогенной активностью. Следует заметить, что в настоящее время генотоксичность широко изучается с привлечением различных тест-систем [7, 8] для природных (лекарственные растения) [9, 10] и, в большей степени, техногенных объектов (органические и неорганические техногенные загрязнители, промышленные отходы, пищевые красители и пр.) [7, 8, 11, 12].

Используемые тест-системы могут быть сгруппированы в зависимости от их биологической, систематической принадлежности и выявляемых нарушений [7]. Биотесты с использованием прокариот позволяют выявить агенты, индуцирующие генные мутации и первичные повреждения ДНК. Биотесты с использованием эукариот обеспечивают выявление большего числа нарушений, от генных мутаций до хромосомных мутаций и анеуплоидии [7]. Высшие растения, являясь хорошими генетическими моделями для выявления загрязнителей окружающей среды, часто используются в мониторинговых исследованиях. Это связано не только с их чувствительностью к мутагенам в различных средах, но и с возможностью выявления нарушения от точечных мутаций до хромосомных aberrаций в клетках различных органов и тканей (в частности, листьях, корнях, пыльце). В настоящее время среди видов высших растений, применяемых в оценке загрязнения окружающей среды наиболее часто, могут быть названы *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia virginiana*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* и *Hordeum vulgare* [7].

Среди названных видов именно лук репчатый *Allium cepa* является предпочтительным тест-объектом, исходя из удобства выявления нарушений хромосом и митотического цикла, а также из наличия крупных хромосом при их сравнительно малом количестве ( $2n = 16$ ). Данная тест-система обнаружила высокую чувствительность в выявлении ксенобиотиков. Впервые лук в качестве тест-системы использовал Levan в 1938 году, продемонстрировав нарушения митотического цикла колхицином [13]. Позднее многие авторы продемонстрировали

способность растворов различных органических веществ вызывать хромосомные аберрации разных типов в меристематических клетках корешка лука. С этого времени был предложен ряд модификаций *Allium*-теста, позволяющих более наглядно и комплексно тестировать вещества, сложные смеси, пробы из природных условий и чистые соединения [14]. Данный тест рекомендован экспертами Всемирной организации здравоохранения как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды [7, 12].

#### Условия и методы исследования

Объектом исследования был опад 5 видов деревьев, произрастающих в дендрарии ботанического сада Самарского государственного университета: дуб красный *Quercus rubra* L., конский каштан обыкновенный *Aesculus hippocastanum* L., черемуха поздняя *Padus serotina* (Ehrh.) Borkh., рябина промежуточная, или скандинавская *Sorbus intermedia* (Ehrh.) Pers., тополь дельтовидный *Populus deltoides* Marsh. Все деревья представляют находящиеся в генеративной стадии дерева хорошего жизненного состояния, возраст деревьев – более 40 лет. Данные виды были выбраны в результате выполненного нами (Е. А. Кудрявцева, 2009) скрининга как объекты, проявляющие различную активность выделений листового опада.

Сбор опада проводили в дендрарии ботанического сада осенью, после опадения листьев (октябрь 2010, 2012 гг.). Листовой опад просушивали и сохраняли до начала биотестирования в условиях лаборатории. Далее проводили для проб опада 2010 г. определение активности водорастворимых, летучих выделений, миазминов и сапролинов с помощью системы биотестов – семян редиса «Красный с белым кончиком», семян и проростков кресс-салата [15].

Для проб опада 2012 г. с помощью стандартной процедуры *Allium*-теста [7, 12] определяли генотоксичность водных экстрактов из листового опада в аспектах изменения числа митозов, распределения по фазам митоза делящихся клеток и частоты появления у делящихся клеток хромосомных аберраций (мостов и фрагментов) в меристеме корней лука посевного *Allium cepa* L., полученных при проращивании на воде (контроль) и вы-

тяжек из опада (опыт) луковиц сорта Штутгартен-Ризен. Все полученные данные обрабатывали математически с помощью пакета прикладных программ «Excel 2003».

#### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены обобщенные результаты биотестовой оценки различных форм выделений из листового опада. Результаты по каждому биотесту (оценка активности миазминов и водорастворимых выделений на прорастание семян редиса, влияние летучих и водорастворимых выделений на рост корней (К) и проростков (П)) рассчитывались в процентах от соответствующих показателей контроля и далее вычислялась разность между контрольными показателями (100 %) и соответствующим вариантом опыта. В таком варианте расчетов ингибирования биотестов соответствуют отрицательные значения, стимуляции – положительные. При полном ингибировании биотеста (расчетный результат 100 %) по всем 6 параметрам сумма должна составлять 600 %, при совпадении опытных и контрольных значений сумма равняется 0, значения выше 0 отражают наличие стимулирующего воздействия.

В данном случае некоторые формы выделений из опада дуба красного, каштана ложноконского, в весьма малой степени – тополя дельтовидного и рябины промежуточной демонстрируют стимуляцию биотестов.

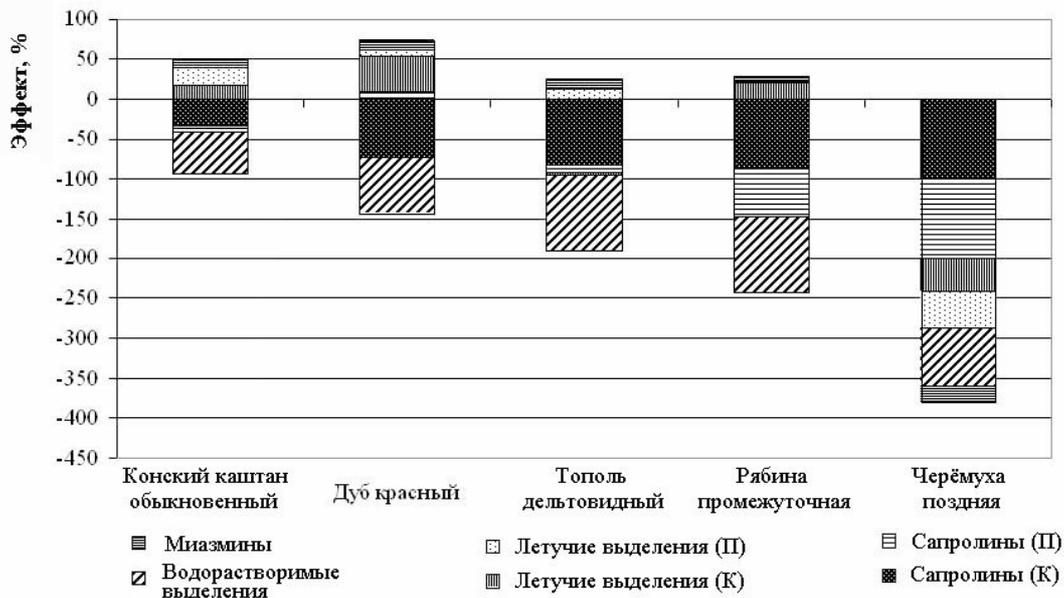
Сапролины и водорастворимые выделения из опада во всех случаях обладают заметным ингибирующим влиянием. Оценивая суммарно аллелопатическую активность опада, можно назвать черемуху позднюю объектом, демонстрирующим наиболее сильное угнетение биотестов, для нее стимуляция не отмечена ни по одному из видов выделений. Различия в характере реакции биотестов, очевидно, связаны с неодинаковым составом самого опада и выделений из него [2–5].

Мы здесь впервые обратились к оценке генотоксического действия для водорастворимых выделений листового опада, для которых была ранее биотестированием показана различная ингибирующая активность. Поскольку необходимо было получить для проведения *Allium*-теста корни лука длиной не менее 10 мм, вытяжки из опада по сравнению с практикой аллелопатического тес-

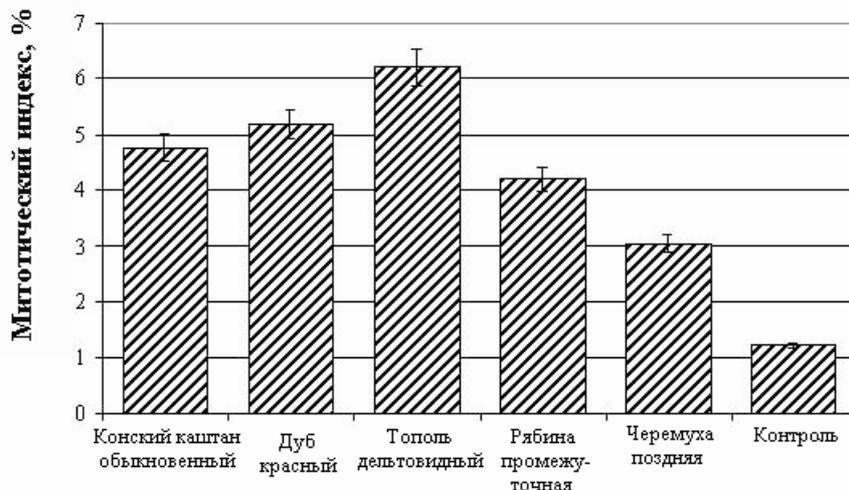
тирования разбавили в 10 раз. Сравнение полученных результатов по показателю митотического индекса представлено на рис. 2. Митотический индекс, характеризующий долю делящихся клеток среди суммы осмотренных при микроскопировании, был минимален в контрольном варианте и выше во всех опытных (различия достоверны при уровне значимости 99,9 %). Поскольку при тестировании возможны как повышение, так и снижение митотического индекса, данный факт пока мы не можем считать проявлением негативного либо стимулирующего воздействия.

Распределение по фазам митоза делящихся клеток в меристеме корней лука, которое разными авторами рассматривается как для всех фаз по отдельности, так и с суммацией ана- и телофазы [7, 10, 12], представлено в первом из вариантов на рис. 3.

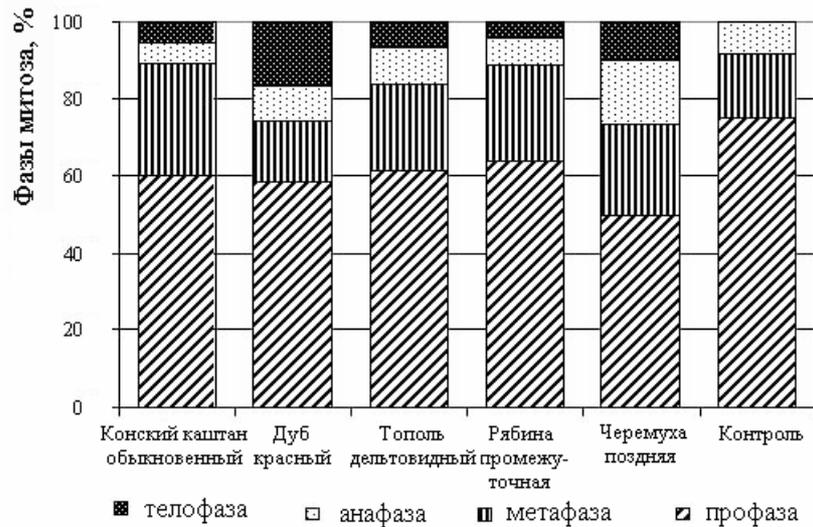
По сравнению с контролем во всех опытных вариантах выявлено снижение доли клеток, находящихся в профазе, и появление клеток в стадии телофазы. Наиболее выражено снижение доли клеток в профазе под влиянием водной вытяжки из опада черемухи поздней.



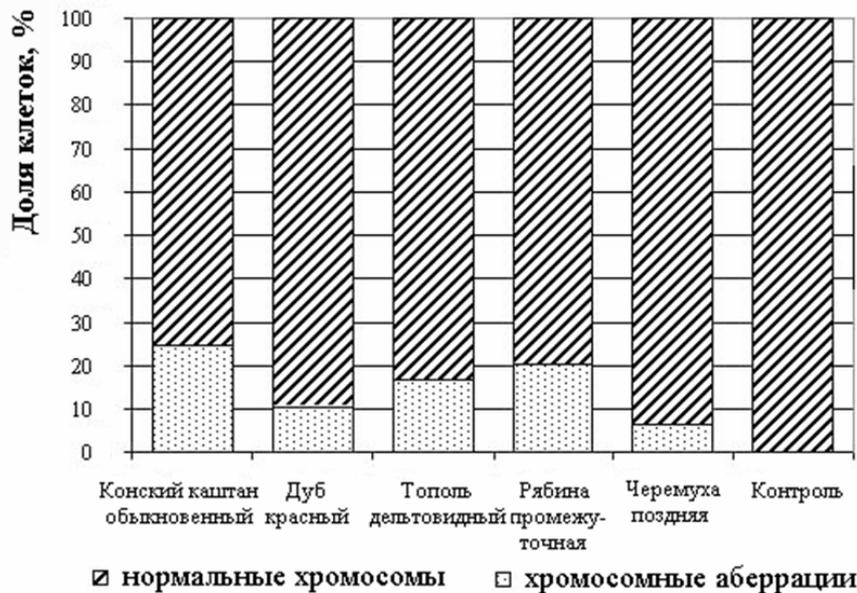
**Рис. 1.** Суммарная оценка активности выделений из листового опада некоторых древесных интродуцентов с помощью системы биотестов (см. пояснения в тексте)



**Рис. 2.** Значения митотического индекса в клетках меристемы корня лука в норме и при воздействии водных вытяжек из листового опада некоторых древесных интродуцентов



**Рис. 3. Распределение по фазам митоза делящихся клеток в меристеме корней лука в норме и при воздействии водных вытяжек из листового опада некоторых древесных интродуцентов**



**Рис. 4. Частота появления у делящихся клеток хромосомных aberrаций в меристеме корней лука в норме и при воздействии водных вытяжек из листового опада некоторых древесных интродуцентов**

В качестве третьего показателя генотоксического влияния, который мы рассмотрели с помощью *Allium*-теста, выступает частота появления у делящихся клеток хромосомных aberrаций (мостов и фрагментов). В выполненной серии экспериментов у клеток контрольного варианта их не выявлено, воздействие вытяжек из опада каштана и рябины вызвало появление наибольшего количества таких нарушений. Другие три объекта обнаружили меньшую активность, минимально выраженную для черемухи поздней (рис. 4).

На данном этапе работы мы располагаем только предварительными результатами, которые будут дополнены большим числом объектов, рассмотрением вопроса о связи химического состава опада и его активности. Однако выполненный корреляционный анализ показал тесную связь доли клеток, у которых наблюдаются aberrации, с видом древесного интродуцента как источника опада, с аллелопатической активностью его сапролинов и водорастворимых выделений. Митотический индекс обнаружил наиболее

тесную связь (высокая степень отрицательной корреляции) с аллелопатической активностью сапролинов и водорастворимых выделений опада (табл.). Связь аллелопатической активности сапролинов и водорастворимых выделений опада (высокая степень положительной либо отрицательной корреляции)

является вполне естественной, различие знаков при коэффициентах корреляции связано с присвоением видам условных баллов («номеров») в матрице данных, составленных для проведения корреляционного анализа, поэтому знак в данном случае несущественен.

**Таблица**

**Оценка связи показателей аллелопатической и генотоксической активности для листового опада некоторых древесных интродуцентов**

Показатели	Вид – источник опада	Влияние сапролинов (корни кресс-салата)	Влияние водорастворимых выделений (корни кресс-салата)	Митотический индекс	Доля клеток с аберрациями	Доля делящихся клеток в профазе	Доля делящихся клеток в метафазе	Доля делящихся клеток в анафазе
Вид – источник опада	1,00							
Влияние сапролинов (корни кресс-салата)	<b>-0,94</b>	1,00						
Влияние водорастворимых выделений (корни кресс-салата)	<b>-0,78</b>	<b>0,91</b>	1,00					
Митотический индекс	0,26	-0,53	<b>-0,78</b>	1,00				
Доля клеток с аберрациями	<b>0,85</b>	<b>-0,87</b>	<b>-0,70</b>	0,41	1,00			
Доля делящихся клеток в профазе	-0,22	0,15	-0,09	0,32	-0,43	1,00		
Доля делящихся клеток в метафазе	0,28	-0,31	-0,55	0,61	0,26	0,58	1,00	
Доля делящихся клеток в анафазе	0,60	-0,56	-0,34	0,11	0,55	0,23	0,30	1,00

### Заключение

Выполненные нами исследования позволили выявить помимо аллелопатической активности наличие генотоксического эффекта у водных вытяжек из листового опада пяти видов деревьев-интродуцентов. Исследование носило модельный характер, поэтому мы не можем утверждать, что подобные явления всегда наблюдаются в природных условиях. Проведение сходных полевых экспериментов позволит ответить на вопрос о

возможности генотоксического влияния аллелохемиков, образуемых данными видами. Однако выявленные ранее факты влияния аллелопатически активных веществ на митозы в корнях различных растений и постоянно отмечаемое угнетение роста корней у объектов-биотестов заставляют предположить, что генотоксическое воздействие аллелопатически активных веществ может протекать в природных условиях и быть составной частью негативного взаимовлияния растений.

### Литература

1. Матвеев Н. М. Аллелопатия как фактор экологической среды. Самара: Книжное издательство, 1994. 206 с.
2. Частухин В. Я., Николаевская М. А. Биологический распад и ресинтез органических веществ в природе. Л.: Наука, 1960. 315 с.
3. Аллелопатическое почвоутомление / под ред. А. М. Гродзинского. Киев: Наукова думка, 1979. 248 с.
4. Гродзинский А. М. Аллелопатия в жизни растений и их сообществ. Киев: Наукова думка, 1965. 206 с.
5. Райс Э. Аллелопатия. М.: Мир, 1987. 391 с.
6. Розно С. А. Об активности выделений древесных и кустарниковых интродуцентов дендрологического сада Куйбышевского сельскохозяйственного института // Вопросы лесной биологии, экологии и охраны природы в степной зоне: межвуз. сб. Куйбышев. 1977. Вып. 2. С. 38–41.
7. Leme D. M., Marin-Morales M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // Mutation Research. 2009. Vol. 682. P. 71–81.
8. Gupta A. K., Ahmad M. Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of refinery waste effluent using plant, animal and bacterial systems // Journal of Hazardous Materials. 2012. Vol. 201–202. P. 92–99.
9. Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria / A. Akintonwaa, O. Awodelea, G. Afolayana [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. 2009. Vol. 125. P. 461–470.
10. Akinboro A., Bakare A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* L. // Journal of Ethnopharmacology. 2007. Vol. 112. P. 470–475.
11. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests / J. Kwasniewska, G. N. Jawecki, A. Skrzypczak [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2012. Vol. 75. P. 55–62.
12. Песня Д. С., Романовский А. В., Прохорова И. М. Исследование токсического и генотоксических эффектов синтетических пищевых красителей методом *Allium test* // Ярославский педагогический вестник. 2012. № 3. Т. III. С. 86–93.
13. Levan A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium* // Hereditas. 1938. Vol. 24. P. 471–486.
14. Fiskesjo G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. 1985. Vol. 102. P. 99–112.
15. Кавеленова Л. М. Практикум по курсу «Основы химического взаимодействия растений» / Куйбышевский университет. Куйбышев, 1987. 114 с.

Статья поступила в редакцию 5.04.2013 г.