

УДК 581.151

СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ ЛИСТА *PISUM SATIVUM* L. ПРИ ДЕЙСТВИИ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ

© 2012 г. Е. А. Ерофеева

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23

E-mail: ele77785674@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.03.11 г.

Окончательный вариант получен 04.05.11 г.

Изучено влияние формальдегида в широком диапазоне доз на стабильность развития третьего листа гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Стабильность развития листа оценивали по изменению величины направленной асимметрии правого и левого листочков, обусловленному флуктуирующей асимметрией данных морфологических структур. При действии токсиканта на исследованный показатель был выявлен парадоксальный эффект. В минимальных из исследованных концентраций формальдегид нарушал стабильность развития листа, что выражалось в возрастании асимметрии правого и левого листочков. В области средних концентраций токсиканта асимметрия была меньше контрольного уровня, что свидетельствовало об увеличении стабильности развития листа гороха. Максимальные исследованные концентрации формальдегида, близкие к сублетальным, вновь снижали стабильность развития листа гороха и приводили к возрастанию асимметрии его листочков по сравнению с контролем.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., лист, асимметрия, формальдегид, парадоксальный эффект.

Стабильность развития характеризует способность организма поддерживать траекторию развития в определенных границах (Захаров, 1987). В качестве меры стабильности развития билатеральных морфологических структур растений широко используется флуктуирующая асимметрия, под которой понимают случайные незначительные отклонения от симметричного состояния (Захаров и др., 2001) вследствие стохастичности молекулярных процессов, обеспечивающих экспрессию генов (онтогенетического шума) (Leamy, Klingenberg, 2005). Флуктуирующая асимметрия, имеющая ненаследственный характер, наблюдается и на фоне наследственных типов асимметрии, таких как антисимметрия и направленная асимметрия (Захаров, 1987). Известно, что величина флуктуирующей асимметрии возрастает при действии любых средовых стресс-факторов (Захаров и др., 2001; Hoffman, Woods, 2003). В связи с этим флуктуирующая асимметрия листа различных видов растений широко используется для оценки уровня загрязнения окружающей среды (Гелашвили и др., 2004). В то же время в последние годы в области токсикологии накапливается все больше свидетельств о том, что кроме классических монотонных зависимостей “доза–эффект” (S-образных; экспоненциальных), достаточно часто встречаются немонотонные ответы, к которым, в частности, относятся гормезис (Kefford et al., 2008; Calabrese, Blain, 2009) и пара-

доксальные эффекты (Батян и др., 2009). Вопрос о том, могут ли подобные явления наблюдаться при действии различных приоритетных загрязняющих веществ на флуктуирующую асимметрию листа растения, до сих пор остается открытым. В настоящее время одним из приоритетных загрязнителей атмосферного воздуха и почвы в крупных городах является формальдегид, что обусловлено быстрым ростом автотранспортного парка (Белкина, 2008). В условиях экосистем урбанизированных территорий на растение действует целый комплекс поллютантов, что затрудняет анализ характера влияния отдельных веществ. Для изучения данного вопроса по сравнению с условиями урбоэкосистем более адекватными являются экспериментальные модели.

В связи с этим целью исследования было изучение стабильности развития листа гороха посевного (*Pisum sativum* L.) по изменению величины направленной асимметрии его листочков, обусловленному флуктуирующей асимметрией данных морфологических структур, при действии формальдегида в широком диапазоне доз в условиях эксперимента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Семена гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Альбумен в течение 5 суток проращивали на дистиллированной воде. После появления корешка проростки контрольной группы поме-

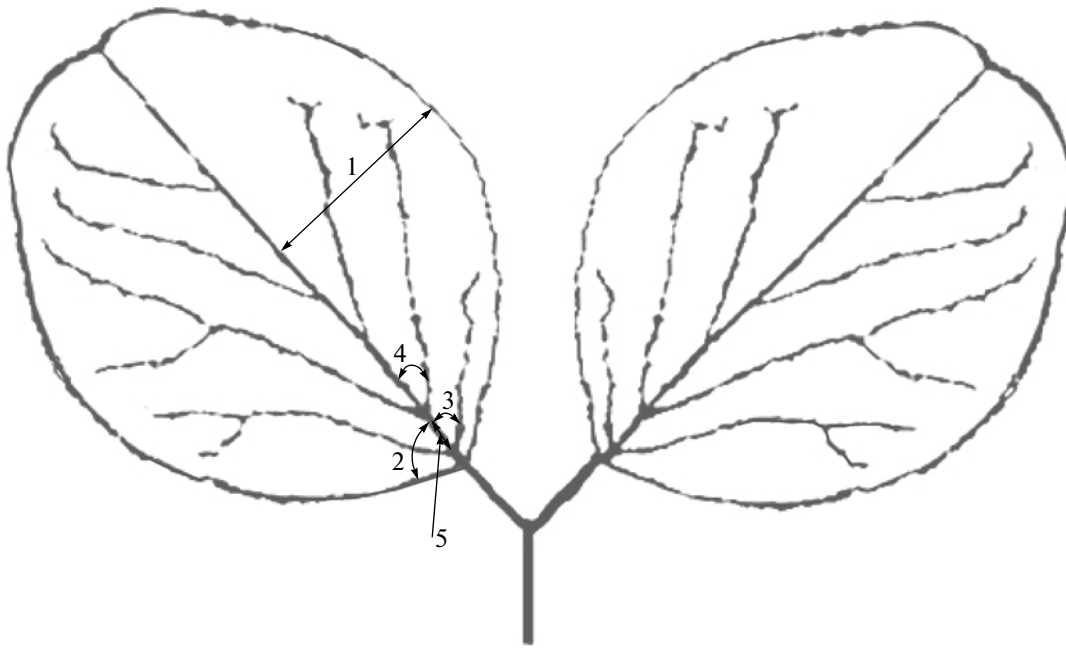


Рис. 1. Промеры правого и левого листочков третьего листа *P. sativum*:

1. 1/2 ширины листочка в районе 1/2 длины центральной жилки; 2. угол между центральной жилкой и нижним краем листа; 3. угол между центральной жилкой и первой снизу жилкой второго порядка; 4. угол между центральной жилкой и второй снизу жилкой второго порядка; 5. расстояние между основаниями первой и второй снизу жилок второго порядка.

щали в сосуды с питательным раствором Кнопа (1 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,25 мМ K_2HPO_4 ; 0,125 мМ MgSO_4 ; 0,25 мМ KNO_3) с добавлением микроэлементов по Хогланду. В 9 опытных группах питательный раствор кроме выше указанных компонентов содержал формальдегид в концентрации от $0,063 \times 10^{-2}$ до 0,16 г/л. Соседние концентрации различались в 2 раза. Диапазон концентраций был подобран в предварительных экспериментах таким образом, чтобы максимальные из использованных концентраций формальдегида были близкими к сублетальным — оказывали значительное токсическое действие на процесс роста побега, но не вызывали гибели растений.

В каждой группе *P. sativum* выращивали в 4 сосудах объемом 250 мл (по 6 растений в 1 сосуде; $n = 24$). Для предотвращения улетучивания формальдегида сосуды были закрыты крышками с небольшими отверстиями, через которые корешок проростков погружали в раствор. Растения контрольной и опытных групп выращивали на выше описанных растворах в течение 16 суток при температуре 20–22°C и семнадцатичасовом световом дне. Через каждые 4 суток растворы заменяли на свежие.

На семнадцатые сутки определяли асимметрию листочков полностью сформировавшегося третьего листа гороха. Лист *P. sativum* является сложным и у сорта Альбумен состоит из двух ли-

сточков. Листья *P. sativum* сразу после сбора сканировали и определяли асимметрию правого и левого листочков. В предварительных экспериментах было установлено, что для листочков *P. sativum* характерна направленная асимметрия — внутренняя (по отношению к плоскости симметрии листа) сторона каждого листочка всегда меньше наружной. Известно, что изменение величины наследственных типов асимметрии (направленной асимметрии, антисимметрии) билатеральных морфологических структур в популяциях одного вида обусловлены флуктуирующей асимметрией (Захаров, 1987). Кроме того, в предварительных экспериментах были подобраны 5 относительно независимых признаков листочка *P. sativum*. Корреляция между признаками отсутствовала, либо была слабой (коэффициент корреляции по Спирмену не превышал 0,20 при $p < 0,05$). Данные признаки использовали для оценки величины асимметрии листочков *P. sativum* при действии формальдегида (рис. 1).

Измерение признаков электронных изображений листочков гороха проводили с помощью программы Adobe Photoshore CS3. Интегральный показатель асимметрии листочка рассчитывали с помощью алгоритма нормированной разности:

$$\bar{A} = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \frac{|L_{ij} - R_{ij}|}{(L_{ij} + R_{ij})}$$

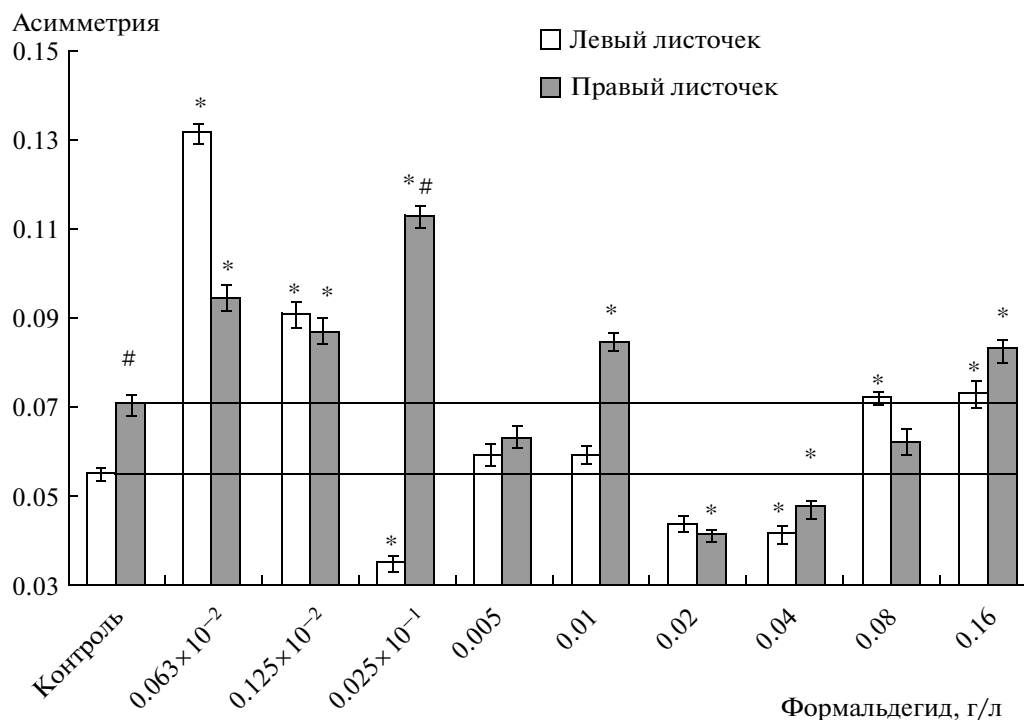


Рис. 2. Влияние формальдегида в широком диапазоне доз на асимметрию правого и левого листочков третьего листа *P. sativum* ($Me \pm S_{Me}$).

Примечание: * – различия статистически значимы по отношению к асимметрии данного листочка в контрольной группе при $p < 0.05$; # – различия статистически значимы по отношению к асимметрии левого листочка этой же группы при $p < 0.05$.

где: L_{ij} и R_{ij} значение j -го признака у i -го листочка, соответственно, слева и справа от плоскости симметрии (Захаров и др., 2000).

При этом величину флуктуирующей асимметрии листочков, наблюдающуюся на фоне направленной асимметрии, не выделяли. В связи с этим, в дальнейшем в статье используется термин “асимметрия листочка”. При этом подразумевается, что различия уровня направленной асимметрии между правыми (или левыми) листочками третьего листа растений разных групп обусловлены величиной их флуктуирующей асимметрии.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программ БИОСТАТИСТИКА 4.03 и STATISTICA 6.0. Для статистического анализа использовали непараметрические тесты Крускала-Уоллиса, Ньюмена-Кейлса и Уилкоксона, поскольку с помощью критерия Шапиро-Уилка было установлено, что выборочное распределение в ряде групп отличалось от нормального. На графиках представлены медианы и их ошибки. При проведении корреляционного анализа рассчитывали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В наиболее низких из исследованных концентраций (0.063×10^{-2} – 0.125×10^{-2} г/л) формальдегид вызывал увеличение асимметрии правого и левого листочков *P. sativum* по сравнению с контрольным уровнем (рис. 2). Однако при дальнейшем возрастании концентрации токсиканта до 0.02–0.04 г/л вместо ожидаемого усугубления нарушения стабильности развития листа *P. sativum*, напротив, отмечалось уменьшение асимметрии правого и левого листочков на 30–40% по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (рис. 2). И, наконец, в области наиболее высоких из исследованных концентраций (0.08–0.016 г/л) формальдегид вновь вызывал увеличение асимметрии сначала у левого листочка, затем – у правого (рис. 2).

С помощью корреляционного анализа по Спирмену было установлено, что между асимметрией правого и левого листочков существует сильная положительная корреляция ($r = 0.81$; $p = 0.010$). В то же время в контрольной и одной из опытных групп (0.005 г/л) величины асимметрии правых и левых листочков *P. sativum* статистически значимо различались.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследования показали, что при увеличении концентрации формальдегида в растворе величина асимметрии правого и левого листочков третьего листа *P. sativum* изменялась не монотонно. Наблюдалось развитие так называемого парадоксального эффекта. Известно, что проявление парадоксальных эффектов сводится к следующему: по мере уменьшения дозы или концентрации воздействующего яда токсичность его увеличивается, и наоборот: при увеличении дозы – эффект уменьшается (Батян и др., 2009). Парадоксальные эффекты выглядят провалами на кривых “доза-эффект” (Булатов и др., 2002). В нашем случае формальдегид в небольших дозах оказывал токсическое действие и приводил к увеличению асимметрии листочков *P. sativum*, в диапазоне средних доз токсичность не проявлялась и стабильность развития морфологических структур листа *P. sativum* в опытных группах даже превышала контрольный уровень. При действии наиболее высоких из исследованных доз формальдегида вновь отмечалось токсическое действие, выражавшее в возрастании асимметрии правого и левого листочков *P. sativum*. Таким образом, в зависимости от дозы формальдегид мог приводить как к снижению стабильности развития морфологических структур листа, так и к увеличению этого показателя, либо не вызывать никакого эффекта.

Полученные нами данные согласуются с результатами некоторых авторов, свидетельствующих о том, что не всегда загрязнение окружающей среды приводит к нарушению стабильности развития различных организмов. Отсутствие увеличения флуктуирующей асимметрии или даже сниженное данного показателя было продемонстрировано при действии химического загрязнения на растения (Ambro-Rappe et al., 2007; Ерофеева и др., 2009), на млекопитающих (Гилева, Косарева, 1994) и насекомых (Leamy et al., 1999), антропогенной нагрузки на амфибий (Вершинин и др., 2007). Возможно, что одной из причин выше перечисленных фактов может служить немонотонный характер зависимостей доза–эффект, одним из проявлений которого являются парадоксальные эффекты.

Для объяснения отсутствия нарушения стабильности развития при действии антропогенной нагрузки высказывались предположения о влиянии стабилизирующего отбора, отсекающего маргинальные варианты индивидуального развития при значительном техногенном загрязнении, в результате чего могло наблюдаться уменьшение дисперсии признаков и снижение среднего значения флуктуирующей асимметрии в популяции (Гилева, Косарева, 1994). При действии формальдегида на стабильность развития листа *P. sativum* в

условиях эксперимента влияние отбора исключено, поскольку выживали все растения опытных и контрольной групп. Поэтому логично предположить, что уменьшение асимметрии обусловлено процессами фенотипической адаптации у *P. sativum*.

В настоящее время механизмы, лежащие в основе немонотонных зависимостей “доза-эффект” при действии различных токсикантов, неизвестны (Батян и др., 2009). Возможно, уменьшение асимметрии листа *P. sativum* в области средних из исследованных концентраций формальдегида обусловлено повышением активности защитных систем растения до уровня, не только компенсирующего токсическое действие поллютанта, но и увеличивающего стабильность морфогенеза листа. Минимальные исследованные концентрации токсиканта еще не способны вызвать такую активацию, а в области максимальных исследованных концентраций, близких к сублетальным, уже начинается “срыв” адаптационных возможностей растения и нарушение стабильности развития листа.

Известно, что развитие формы листа растений, в том числе и его симметрии, контролируется рядом генов, которые изучены преимущественно у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. К ним относятся такие гены как *AS1*, *AS2*, *CP3*, *AN1* и др. (Semiarti et al., 2001; Кирпичева, Соколов, 2009). Повышение стабильности развития листа у *P. sativum* при действии формальдегида может быть обусловлено снижением флуктуаций молекулярных процессов, лежащих в основе экспрессии подобных генов. Возможными механизмами данного эффекта может быть увеличение активности ферментов детоксикации формальдегида, например глутатионзависимой формальдегиддегидрогеназы, обеспечивающей связывание токсиканта с глутатионом (Díaz et al., 2003), а также антиоксидантной системы, препятствующей повреждению белков активными формами кислорода (Полесская, 2007).

Таким образом, на основании выше сказанного можно заключить, что формальдегид в широком диапазоне доз вызывал немонотонное изменение стабильности развития третьего листа *P. sativum*, оцененную по изменению величины направленной асимметрии правого и левого листочков, обусловленному флуктуирующей асимметрией данных морфологических структур. При действии токсиканта на исследованный показатель был выявлен парадоксальный эффект. В минимальных из исследованных концентраций формальдегид нарушал стабильность развития листа, что выражалось в возрастании асимметрии правого и левого листочков. В области средних концентраций токсиканта асимметрия была меньше контрольного уровня, что свидетельствовало об увеличении стабильности развития листа гороха. Максимальные исследованные концен-

трации формальдегида, близкие к сублетальным, вновь снижали стабильность развития листа гороха и приводили к возрастанию асимметрии его листочков по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батян А.Н., Фруммин Г.Т., Базылев В.Н. Основы общей и экологической токсикологии. СПб.: СпецЛит., 2009. 352 с.
- Белкина Т.Д. Состояние городов России 2008. М.: "Город-Регион-Семья", 2008. 146 с.
- Булатов В.В., Хахаев Т.Х., Дикий В.В. и др. Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии. Фундаментальные и прикладные аспекты // Российский химический журнал. 2002. Т. XLVI. № 6. С. 58–62.
- Вершинин В.Л., Гилева Э.А., Готов Н.В. Флуктуирующая асимметрия мерных признаков у остромордой лягушки: методические аспекты // Экология. 2007. № 1. С. 75–77.
- Гелашвили Д.Б., Чупрунов Е.В., Иудин Д.И. Структурные и биоиндикационные аспекты флуктуирующей асимметрии билатерально-симметричных организмов // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65. № 5. С. 433–441.
- Гилева Э.А., Косарева Н.Л. Уменьшение флуктуирующей асимметрии у домашних мышей на территориях, загрязненных химическими и радиоактивными мутагенами // Экология. 1994. № 3. С. 94–97.
- Ерофеева Е.А., Сухов В.С., Наумова М.М. Двухфазная зависимость некоторых эколого-морфологических и биохимических параметров листовой пластинки березы повислой от уровня автотранспортного загрязнения // Поволжский экологический журнал. 2009. № 4. С. 50–57.
- Захаров В.М., Чубинишвили А.Т., Дмитриев С.Г. и др. Здоровье среды: Практика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 318 с.
- Захаров В.М. Асимметрия животных. М.: Наука, 1987. 216 с.
- Захаров В.М., Жданова Н.П., Кирик Е.Ф. и др. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 6. С. 40–421.
- Курничева И.В., Соколов И.Д. Экспрессия генов AN1, AN3, ASI, CP3 в листьях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Науковий вісник ЛНАУ. 2009. № 8. С. 26–32.
- Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007. 140 с.
- Ambo-Rappe R., Lajus D.L., Schreider M.J. Translational Fluctuating Asymmetry and Leaf Dimension in Seagrass, *Zostera capricorni* Aschers in a Gradient of Heavy Metals // Environmental Bioindicators. 2007. V. 2. I. 2. P. 99–116.
- Calabrese E.J., Blain R.B. Hormesis and plant biology // Environmental Pollution. 2009. V. 157. P. 42–48.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M.C. The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid // FEBS Letters. 2003. V. 543. № 1–3. P. 136–139.
- Hoffmann A.A., Woods R.E. Associating environmental stress with developmental stability: problems and patterns // See Polak. 2003. P. 387–401.
- Kefford B.J., Zaluzniak L., Warne M.St.J., Nuggegod D. Is the integration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora's Box? // Environmental Pollution. 2008. V. 151. № 3. P. 516–523.
- Larry J., Leamy I., Klingenberg C.P. The genetics and evolution of fluctuation asymmetry // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2005. V. 36. P. 1–21.
- Leamy L.J., Doster M.J., Huet-Hudson Y.M. Effects of methoxychlor on directional and fluctuating asymmetry of mandible characters in mice // Ecotoxicology. 1999. V. 8. P. 63–71.
- Semiarti E., Ueno Y., Tsukaya H., Iwakawa H., Machida C., Machida Y. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves // Development. 2001. V. 128. P. 1771–1783.

Developmental Stability of a Leaf of *Pisum Sativum* L. under the Influence of Formaldehyde in a Wide Range of Doses

E. A. Erofeeva

Nizhni Novgorod State University, Nizhni Novgorod, 603950 Russia
e-mail: ele77785674@yandex.ru

Abstract—The influence of formaldehyde in a wide range of doses on the stability of development of the third leaf of pea (*Pisum sativum* L.) was studied. The developmental stability of the leaf was assessed by the change in the value of the directional asymmetry of the right and left leaflets caused by the fluctuating asymmetry of these morphological structures. When subjected to a toxic agent, the studied parameter exhibited a paradoxical effect. In minimum studied concentrations, formaldehyde disturbed stability of leaf development, which was manifested in an increase in the asymmetry of the right and left leaflets. At medium concentrations of the toxicant, the asymmetry was less than the control level, which indicated an increase in the developmental stability of the pea leaf. Maximum studied concentrations of formaldehyde, close to sublethal, again reduced the stability of development of the pea leaf and led to an increase in the asymmetry of its leaflets compared with the controls.

Keywords: *Pisum sativum* L., leaf, asymmetry, formaldehyde, paradoxical effect