

Государственное казенное учреждение дополнительного образования
«ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР»
Министерства образования, науки и по делам молодежи
Кабардино-Балкарской Республики
г. Нальчик

Номинация «Экологический мониторинг»

Объединение «Основы учебно-исследовательской деятельности»

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫСОКОГОРЬЯ НА УРОВЕНЬ МУТАЦИЙ У
РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО
(*Taraxacum officinale* Wigg.s.l)

Реутова Полина Васильевна
11 класс

Руководитель:
Гузиев Хусейн Юсупович
Зав. отд. Естественных наук
ГКУ ЭБЦ

Нальчик 2019

Оглавление

	стр
Введение	3
Глава I Описание места исследования	4
Глава II Материалы и методы	6
2.1 Одуванчик лекарственный (<i>Taraxacum officinale</i> Wigg.s.l)	6
2.2 Методика проведения опыта	6
Глава III Результаты и обсуждение	8
2.1 Уровень мутаций у О. лекарственного (<i>T. officinale</i>) на разных высотах	8
2.2 Обсуждение результатов	10
Выводы	11
Литература	11

Введение

Кабардино-Балкарская Республика в силу своего расположения на высотах от 200 до более чем 5000 метров над уровнем моря является идеальной площадкой для сравнительного изучения влияния природного стресса на живые организмы. Целью данной работы является изучение влияния условий высокогорья на уровень мутаций у растений. Целый ряд растений может произрастать в широком диапазоне высот. Одним из таких видов является одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.s.l). Представители этого вида вслед за человеком при строительстве канатных дорог поднялись до высот 3000 м над уровнем моря. Поэтому эти растения, произрастающие на разных высотах, были выбраны в качестве объекта исследования.

Задачами исследования были:

1. Изучение особенностей почвенно-климатических условий степной и горной зоны;
2. Выбор мест сбора семян растений и изучение климатических условий в выбранных районах;
3. Овладение методикой приготовления микропрепаратов и анализа клеток на разных фазах митоза;
4. Определение частоты мутаций в корневой меристеме проростков из семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах;
5. Проведение сравнительного анализа полученных результатов.

В Кабардино-Балкарском научном центре РАН и Республиканском эколого-биологическом центре уже на протяжении ряда лет ведутся работы по изучению влияния условий высокогорья на растения. Так, в ранее проведенных исследованиях было выявлено, что у растений одуванчика на высоте 2000 м повышен митотический индекс. Причем это повышение обусловлено большей частотой ана/телофаз [1]. Также было выявлено, что с увеличением высоты над уровнем моря увеличивается масса семян у растений одуванчика лекарственного и подорожника большого [2]. В данной работе нами впервые было проведено сравнительное изучение уровня мутаций у семенного потомства растений, обитающих на склонах Эльбруса (высота 3000 м), растений, обитающих на высоте 2000 м (Приэльбрусье) и растений степной зоны (высота 200 м над уровнем моря).

Полученные результаты внесут определенный вклад в исследование проблемы влияния экстремальных природных условий среды на растения.

Глава I Описание места исследования

Расположенная в относительно низких южных широтах (между 42° 05'1" и 44°00'1" северной широты), территория Кабардино-Балкарской Республики получает значительные суммы солнечной радиации, что определяет обилие солнечного света и тепла. Максимальные суммы радиации поступают в мае-июле при наибольших высотах солнца и продолжительности дня. Территория КБР, отгороженная с юга и юго-запада горами Большого Кавказа, открыта с севера и северо-запада для свободного вторжения холодных воздушных масс из Арктики. Рельеф оказывает большое влияние на распределение осадков, усиливая их выпадение при вхождении на территорию республики влажных воздушных масс.

Горный рельеф вызывает высотную зональность климата, особенно ярко выраженную в высокогорной области Центрального Кавказа. На общее изменение температуры и влажности воздуха с высотой накладывается изменение циркуляции воздуха в высоких слоях атмосферы. В горах, начиная с высоты примерно 2000 м, ведущая роль принадлежит западному переносу воздуха.

На территории КБР по условиям теплообеспеченности и условиям увлажнения можно выделить типы климатов: континентальный (степная зона, северо-восточная часть); умеренно - континентальный (предгорная часть); высокогорный (горная часть).

Осадки на территории республики распределяются крайне неравномерно: очень малое количество выпадает на северо-востоке - менее 300 мм, в то время как на наветренных склонах в высокогорьях выпадает свыше 1000 мм. На распределение осадков в большой степени влияет характер поверхности. В режиме осадков наблюдается следующая особенность: большая часть осадков выпадает в теплое время года - с апреля по октябрь осадки увеличиваются по сравнению с холодным периодом в 3-4 раза. По условиям увлажнения территорию КБР можно разделить на три района:

степная зона. Засушливый климат с недостаточным, неустойчивым увлажнением (300-400 мм), коэффициент увлажнения 0,7-0,9;

предгорная зона (500-1000мм). Умеренно влажный климат с нормальным увлажнением (400-600мм), коэффициент увлажнения 1,1-1,3;

высокогорная зона. Влажный климат с избыточным увлажнением (600-1000мм и более), коэффициент увлажнения более 1,7.

Давление воздуха с высотой уменьшается в среднем на 10 мм на каждые 100 м подъема. Среднее годовое атмосферное давление 740 мм. рт. ст. - самое высокое наблюдается на востоке. Оно уменьшается по мере продвижения к западу и юго-западу вследствие увеличения высоты над уровнем моря и составляет менее 600 мм. рт. ст. в высокогорьях Большого Кавказа [3].

Темно-каштановые почвы с содержанием 3-4% гумуса распространены в северо-восточной части (Прохладненский и Терский районы). Горно-

тундровые почвы встречаются на Главном и Боковых хребтах, около ледников и снежников. Почвенный покров толщиной до 5 см представлен главным образом слаборазложившимся торфом. Горно-луговые почвы распространены выше 2000 м в зоне субальпийской и альпийской растительности. Они имеют различную толщину темного слоя (20-60 см), содержит 12-13% перегноя. На этих почвах расположены пастбища и сенокосные угодья республики [3].

Высокогорье является особой средой обитания, которая отличается от прочих сред совокупностью некоторых специфических признаков. Для высокогорья характерна суровость абиотических условий:

- 1) достаточно жесткий термический режим и связанные с ним криогенные явления, поздняя вегетация, летние заморозки, снегопады, пониженная влажность, сильные ветры и пр.
- 2) высокогорья отличаются интенсивностью таких мутагенных факторов как солнечная (ультрафиолет) инсоляция и повышенная радиация коренных пород и космического излучения, что, в целом, способствует более высокой интенсивности мутагенеза.
- 3) высокогорьям свойственна мозаичность распределения участков с оптимальными условиями, в том числе гнездовыми и кормовыми, что часто способствует относительной изолированности микропопуляций.
- 4) Фактор пониженного парциального давления кислорода в воздухе

Основным экологическим фактором, лимитирующим развитие растений, являются низкие температуры, на фоне которых значение остальных факторов, специфичных для высокогорий и высоких широт, имеет подчиненное значение.

Глава II Материалы и методы

2.1. Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.s.l)

Одуванчик лекарственный — многолетнее травянистое растение. Достигает 30 см в высоту, толщина корня около 2 см и длина около 60 см. В верхней части переходит в многоглавое корневище. Листья одуванчика голые, перисто-надрезанные или цельные, ланцетные или продолговато-ланцетные, зубчатые, длиной 10—25 см, шириной 1,5—5 см, собранные в прикорневую розетку.

Плод — серовато-бурая веретенообразная семянка с хохолком, состоящим из белых неветвистых волосков. Семянки прикреплены к цветоложу непрочны и легко разносятся ветром.

Все части растения содержат густой белый млечный сок, горький на вкус. Цветёт одуванчик в мае—июне, иногда наблюдается осеннее цветение, плодоносит — с конца мая по июль.

Одуванчик лекарственный — одно из самых распространённых растений, особенно в лесостепной зоне. Растёт на лугах, полянах, около дорог, на выгонах и у жилья, часто как сорняк в полях, садах, огородах и парках в европейской части России, на Украине, в Беларуси, на Кавказе, в Молдове, Приднестровье в Средней Азии, Сибири, на Дальнем Востоке, на Сахалине, Камчатке.



Фото 1. Растения одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.s.l)

2.2. Методика проведения опыта

Семена собирали в степной зоне КБР (высота 200 м), в Приэльбрусье на поляне гостиницы Иткол (высота 2000 м) и на склоне Эльбруса в районе станции Старый кругозор (высота 3000 м). В степной зоне семена собирали в мае, а на высотах 2000 и 3000 м в последней декаде июля в 2018 г. Всего на каждой высоте собирали семена не менее чем с 30 растений и смешивали их.



Фото 2. Сбор семян в Приэльбрусье (высота 2000 м над у.м.)

Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге с добавлением водопроводной воды в течение 10 дней. По мере необходимости фильтровальную бумагу увлажняли. Время между сбором и проращиванием семян составляло один месяц.

Проросшие корешки длиной 10-15 мм фиксировали в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Длительность фиксации не менее 24 ч. Затем проростки промывали и помещали в 70⁰ спирт. Зафиксированный материал можно хранить достаточно долго (1-2 месяца) в холодильнике при +4⁰С.

Зафиксированные проростки окрашивали ацетоорсеином (2% раствор орсеина в 45% уксусной кислоте), доводя до стадии начала закипания. В красителе препараты можно хранить в течение нескольких дней. Перед приготовлением препаратов окрашенные проростки помещали в 45% уксусную кислоту для осветления цитоплазмы. Готовили временные давленные препараты из меристемы кончиков корней по общепринятой методике [4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием преобразования Фишера для сравнения долей [5].

Глава III Результаты и обсуждение

3.1 Уровень мутаций у *O. лекарственного* (*T. officinale*) на разных высотах

Для изучения влияния условий высокогорья на частоту мутаций у растений мы использовали клетки корневой меристемы проростков семян, собранных на разных высотах. В различных фазах митоза встречались следующие виды хромосомных аномалий (ХА):

- профазе (рис. 1а), в ней крайне редко могут встречаться микроядра. В нашем исследовании мы их встретили только один раз;
- в метафазе могут быть потерянные хромосомы (рис. 1в), которые лежат не на экваторе клетки и попадают в дочерние клетки случайным образом. В последствии из них формируются микроядра;
- в анафазе и телофазе могут быть разнообразные аномалии. Фрагменты и множественные фрагменты в зависимости от размера могут быть результатом делеции (обычно мелкие рис. 1е), отставшими хромосомами (обычно крупного размера рис. 1ж), а также множественные фрагменты. В результате более сложных хромосомных перестроек с формированием дицентрических хромосом появляются «мосты» (рис. 1з) и двойные «мосты» (рис. 1и).

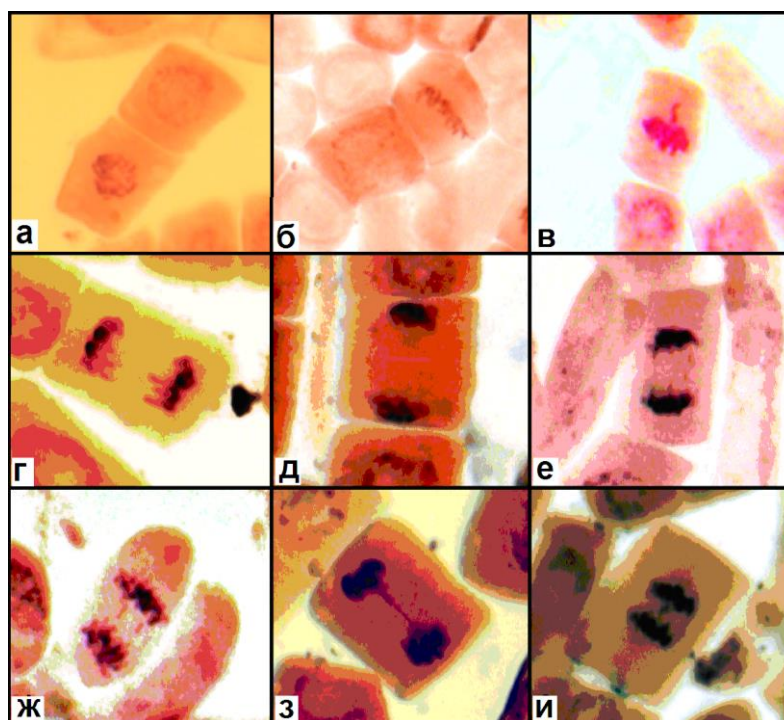


Рис. 1. Клетки корневой меристемы одуванчика лекарственного (*T. officinale*.)

а – нормальная профазе; б – нормальная метафазе; в – метафазе с потерянной хромосомой; г – нормальная анафазе; д – нормальная телофазе; е – анафазе с фрагментами; ж - анафазе с отставшими хромосомами; з – анафазе с «мостом»; и – анафазе с двойным «мостом».

Полученные результаты приведены в таблицах 1 и 2. На высоте 2000 м над уровнем моря значительно возросла частота всех типов хромосомных aberrаций в метафазе и ана/телофазе. Общее число мутантных клеток на этой

высоте было в 8,9 раза выше, чем на высоте 200 м (табл. 1). На высоте 3000 м общая частота хромосомных aberrаций возросла в 13,8 раза.

Поскольку наибольшим разнообразием отличаются хромосомные aberrации в ана/телофазе, в таблице 2 приведены эти данные. В большей степени увеличилась частота клеток с фрагментами по сравнению с «мостами».

Таблица 1. Частота хромосомных aberrаций на разных высотах

Высота над у.м. (м)	Профаза			Метафаза			Ана/телофаза			Всего ХА	%
	Всего клеток	В т.ч. с ХА	%	Всего клеток	В т.ч. с ХА	%	Всего клеток	В т.ч. с ХА	%		
200	456	0	0	1561	3	0,19	817	14	1,71	17	0,60
2000	531	1	0,19	1034	54	5,22*	1139	90	7,90*	145	5,36*
3000	432	0	0	926	106	11,45*	1024	91	8,88*	197	8,27*

*- P<0.001.

Таблица 2. Хромосомные aberrации в ана/телофазе(по типам мутаций)

Высота над у.м. (м)	Всего клеток в ана/телофазе	В т.ч. с фрагментами	%	В т.ч. с «мостами»	%	В т.ч. с дв. «мостами»	%	Всего
200	817	5	0,61	8	0,98	1	0,12	14
2000	1139	66	5,79*	23	2,02	1	0,09	90
3000	1024	74	7,22*	17	1,66	0	0	91

*- P<0.001.

Для проверки достоверности выявленных различий мы использовали преобразование Фишера для сравнения долей [5], которые преобразуются:

$$\varphi = 2 \arcsin \sqrt{p},$$

$$p = \frac{n}{N},$$

где n - % клеток с хромосомными aberrациями,

N – количество просмотренных клеток.

Значения φ брали из соответствующих таблиц (В.Ю. Урбах, 1963).

$$u = (\varphi_1 - \varphi_2) \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}},$$

где n – объем выборки (в нашем случае количество просмотренных клеток).

Если $u > 2,58$, то $p < 0,01$;

если $u > 3,29$, то $p < 0,001$;

если $u < 1,96$, то отличия не достоверны.

В нашем исследовании мы определяли достоверность различий в частоте мутаций для растений, произрастающих на высотах 2000 и 3000 м над уровнем моря в сравнении с высотой 200 м. Для высоты 2000 м для метафаз $u=9,30$; для ана/телофаз $u=6,71$; для общего числа мутаций $u=11,60$. Для высоты 3000 м для метафаз $u=14,51$; для ана/телофаз $u=12,90$ и для общего числа мутаций $u=15,43$. Следовательно, во всех случаях $P < 0,001$ и выявленные различия высоко достоверны.

3.2 Обсуждение результатов

В ранее проведенных исследованиях было выявлено, что экстремальные условия высокогорья влияют на ряд морфологических и физиологических признаков растений. Так Кулиевой А. [2] было выявлено, что с увеличением высоты над уровнем моря увеличивается масса семян; уменьшается высота растений, что является общеизвестным фактом; не изменяется количество соцветий на одно растение и количество семян на одно соцветие; уменьшается всхожесть семян. Дышекова [1] изучала митотический индекс у растений одуванчика лекарственного на высотах 200 и 2000 м и выявила, что он выше в клетках корневой меристемы проростков из семян растений, произрастающих на высоте 2000 м.

Мы изучали частоту мутаций у семенного потомства растений, произрастающих на высотах 200, 2000 и 3000 м над уровнем моря. В результате проведенных нами исследований было выявлено, что экстремальные условия высокогорья вызывают повышение частоты мутаций у семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах. Так общее число мутаций в корневой меристеме семенного потомства растений, произрастающих на высоте 2000 м, было в 8,9 раза выше, чем у растений, произрастающих на высоте 200 м, а на высоте 3000 м – выше в 13,8 раза. Для отдельных фаз митоза эти различия составили: метафаза – 27,5 и 60,2 раза для высот 2000 и 3000 м соответственно; ана/телофаза – 4,6 и 5,2 раза соответственно. Если сравнивать высоты 2000 и 3000 м, то общая частота ХА больше на высоте 3000 м, но эти различия статистически не значимы. Таким образом, нами было выявлено, что под влиянием условий высокогорья увеличивается частота мутаций у семенного потомства растений, произрастающих на разных высотах.

Выводы

- у семенного потомства растений, произрастающих в экстремальных условиях высокогорья, значительно увеличивается частота хромосомных aberrаций;
- чем больше высота над уровнем моря, тем выше частота мутаций у растений.

Литература

1. Дышекова М. Особенности цитогенетического статуса растений высокогорья. Нальчик. 2012.
2. Кулиева А. Влияние условий высокогорья на ряд признаков одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.s.l) и подорожника большого (*Plantago major* L.)
3. Емузова Л.Г. Физическая география Кабардино-Балкарской Республики. Нальчик. Эльбрус.
4. Дубинина Л.Г. Структурные мутации в опытах с *Crepis capillaris* L. М. Наука, 1978. С.188
5. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М. Изд-во Академии наук СССР. 1963. 306с.