

М.Г. Малева, Г.Г. Борисова, Н.В. Чукина, А.С. Желнарчук, П.Е. Новиков,
Е.И. Филимонова

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
г. Екатеринбург, maria.maleva@mail.ru

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОРХИДЕИ *LISTERA OVATA*, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ЕЕ НАТУРАЛИЗАЦИИ В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ ЗОЛОТВАЛА

В условиях меняющейся биосферы происходит сокращение естественных ареалов редких видов растений, включая представителей семейства Orchidaceae. Как правило, орхидеи представлены малочисленными популяциями, приуроченными к определенным экологическим нишам, характеризуются низкой конкурентоспособностью [Мамаев и др., 2004; Vakhrameeva et al., 2008].

Listera ovata (L.) R.Br. (тайник яйцевидный/овальный) – редкий вид семейства Orchidaceae, занесенный в Красную книгу Свердловской области [Красная книга Свердловской области, 2018]. Это короткочерневищный травянистый многолетник, мезофит, факультативный кальцефил, бореально-неморальный вид. Ареал охватывает всю Европу и достигает Восточной Сибири в Азии [Brzosko, 2002]. На Урале данный вид распространен от горных районов Приполярного Урала до лесостепной зоны Южного Урала [Филимонова и др., 2018]. Для *L. ovata* характерны крупные эллиптически-овальные листья, расположенные ниже середины стебля. Цветки крупные, на коротких, слегка железистых цветоножках [Wiegand, 1899]. Опыление происходит с помощью насекомых. Помимо семенного размножения, возможно и вегетативное [Brzosko, 2002; Brys et al., 2008]. Для прорастания семян и развития растения в первые годы его жизни необходимо присутствие гриба. Тайник яйцевидный растет как на плодородных, так и на бедных почвах. Адаптивен к условиям полутени, но может произрастать и на открытых местах [Вахрамеева и др., 2014].

В последние десятилетия отмечено, что антропогенно трансформированные экотопы, включая территории, нарушенные добывающей и перерабатывающей промышленностью, на ранних стадиях сукцессии могут заселяться некоторыми редкими видами орхидных [Jurkiewicz et al., 2001; Shefferson et al., 2008; Филимонова и др., 2018; Filimonova et al., 2019]. Имеются данные, что *L. ovata* иногда встречается и в нарушенных местообитаниях, по обочинам шоссе и железных дорог, в заброшенных известняковых карьерах [Вахрамеева и др., 2014].

Изучение структурно-функциональных особенностей редких видов семейства Orchidaceae в техногенно нарушенных экотопах необходимо для решения прикладных задач, связанных с выявлением оптимальных условий для их интродукции и натурализации. Однако сведения об адаптивных морфофизиологических характеристиках орхидей, способствующих колонизации техногенных субстратов, являются фрагментарными.

Особый интерес вызывают ценопопуляции *L. ovata*, обнаруженные в последние годы на техногенно нарушенных территориях Среднего Урала, включая золотвалы тепловых электростанций [Филимонова и др., 2018]. Как известно, зольные субстраты характеризуются низкой микробиологической активностью, недостаточной обеспеченностью биогенными элементами, особенно доступным азотом и неблагоприятными физико-химическими свойствами [Чибрик и др., 2011]. В связи с этим представляется целесообразным сравнительное исследование некоторых морфофизиологических параметров *L. ovata* из природных местообитаний для выявления особенностей этой редкой орхидеи, способствующих адаптации к неблагоприятным эдафическим условиям.

Отбор почвенного и растительного материала проводили в окрестностях города Верхний Тагил Свердловской области в период цветения орхидеи (середина июля) из естественного (участок 1) и техногенно нарушенных местообитаний (участки 2 и 3).

Участок 1 (57°20'13"N 60°01'43"E) представляет собой естественный лесной фитоценоз в окрестностях поселка Белоречка. Сомкнутость крон древесных – 0.8; общее проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса – 70–80 %.

Участок 2 (57°20'45"N 59°56'46"E) – нерекультивированный участок золоотвала Верхнетагильской ГРЭС (ВТГРЭС), расположенного в горной котловине долины р. Тагил (бассейн р. Тобол). Возраст растительного сообщества около 35 лет. Лесной фитоценоз характеризуется сомкнутостью 0.5–0.6. Общее проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса – 20–25 %.

Участок 3 (57°20'20"N 59°56'29"E) – рекультивированный участок золоотвала ВТГРЭС, на котором, начиная с 1968 г., проводилась частичная биологическая рекультивация. На почву наносили глину, взятую из расположенного рядом карьера, полосами шириной 8–10 м и толщиной наносимого слоя – 15–20 см. Возраст местного растительного сообщества около 45 лет. Сомкнутость крон древесных – 0.6–0.7. Общее проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса – 35–40 %.

Популяции тайника на обоих участках золоотвала были более многочисленными, по сравнению с популяцией из естественного лесного фитоценоза. Очевидно, это объясняется тем, что в естественном экотопе растения *L. ovata*, для которых характерна слабая конкурентная способность, испытывали ярко выраженный фитоценотический стресс.

Для достижения поставленной цели были изучены: накопление металлов, содержание общего азота и фосфора в листьях и корнях и анатомо-морфологические (мезоструктура листа) параметры *L. ovata*.

Содержание металлов в почве, корнях и листьях определяли при помощи атомно-абсорбционной спектрометрии на Varian AA240FS (США) после озоления образцов 70 % HNO₃. Коэффициент биологического накопления (КБН) металлов рассчитывали, как отношение количества металлов в листьях/корнях к их валовому содержанию в почве.

Содержание общего азота и фосфора в листьях *L. ovata* измеряли спектрофотометрически после мокрого озоления растительного материала смесью кислот: H₂SO₄ и HClO₄. Определение общего азота проводили с помощью реактива Несслера, а общего фосфора – с молибдатом аммония в кислой среде.

Для изучения характеристик мезоструктуры фотосинтетического аппарата с 10 генеративных особей данного вида из каждого местообитания отбирали высечки с нижних, полностью сформированных листьев. Поперечные срезы получали с использованием замораживающего микротомы МЗ–2 (Россия). Мезоструктурные параметры (толщина листа, эпидермиса и мезофилла, количество и объем клеток мезофилла и хлоропластов) определяли согласно [Мокроносов, 1978] в 30 повторностях при помощи системы Simagis Mesoplant (Россия) с использованием светового микроскопа Meiji MT 4300L (Япония). Удельную поверхностную плотность листа (УППЛ) рассчитывали, как отношение сухой массы к площади; клеточный объем хлоропласта (КОХ) – как отношение объема клетки к числу хлоропластов; индекс проективной поверхности хлоропластов (ИПХ) – как отношение суммарной проективной площади хлоропластов к площади листа; индекс поверхности наружных мембран хлоропластов (ИМХ) – как отношение общей поверхности наружных мембран хлоропластов к площади листа.

В таблице представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными буквами отмечены достоверные различия между тремя изученными ценопопуляциями. Достоверность различий оценивали в программе Statistica 10.0 с использованием множественного рангового критерия Дункана ($p < 0.05$).

Исследование показало, что содержание большинства металлов (как валовое, так и растворимая форма) в зольных субстратах было ниже по сравнению с почвой естественного фитоценоза. Однако для Co, Ni, и K была отмечена другая тенденция: их количество было максимальным на рекультивированном золоотвале. При этом обнаружено сходное распределение по валовому содержанию металлов: Fe > Ca > Mg > Mn ≥ K > Zn > Pb > Cu > Cr > Ni > Co. Значения КБН для большинства изученных металлов были ≤ 1. Исключение составили

макроэлементы (калий, кальций, магний), КБН которых были существенно выше. Причем, из них выделялся калий: его КБН в корнях орхидеи составлял в среднем 40, а в листьях – 150. Большее количество металлов, содержащихся в растениях *L. ovata*, аккумулировалось в корнях, за исключением макроэлементов и некоторых тяжелых металлов (никель, хром).

Известно, что зольные субстраты очень бедны азотом. Как и ожидалось, листья *L. ovata* на золоотвале отличались меньшим количеством общего азота по сравнению с особями из естественного фитоценоза (минимальное – на нерекультивированном участке). При этом содержание общего фосфора в листьях орхидеи на золоотвале было выше, чем в естественном фитоценозе. Вместе с тем, растения *L. ovata* на втором и третьем участках отличались пониженным, по сравнению с первым, содержанием фосфора в корнях. Вероятно, это связано с активным переходом фосфора в надземную часть растения. Ввиду того, что фосфор участвует во многих биохимических, энергетических, физиологических процессах, его транслокацию из корней в листья, очевидно, можно расценивать как проявление одной из адаптивных реакций.

Известно, что изменение фотосинтетического аппарата листа имеет большое значение при адаптации растений к условиям среды. Интенсивность фотосинтеза, с одной стороны, зависит от активности фотосинтетических ферментов, с другой – во многом определяется внутренним строением листовой пластинки, которое обуславливает оптические свойства и скорость диффузии углекислого газа внутри листа к центрам карбоксилирования [Мокроносов и др., 2006].

Наши исследования показали, что адаптация растений тайника к техногенным субстратам происходит на разных уровнях организации фотосинтетического аппарата.

Удельная поверхностная плотность листа (УППЛ) является интегральным листовым параметром, увеличение которого может свидетельствовать об изменениях внутренней структуры и химического состава листа: числа и размеров клеток мезофилла, доли механических и проводящих тканей, содержания углерода и азота в листе [Van Arendonk, Poorter, 1994; Иванов и др., 2008].

Исследования показали, что растения тайника из естественного фитоценоза имели наибольшие значения данного показателя. Вероятно, это связано со снижением содержания азота в листьях растений с золоотвала, что согласуется с литературными данными [Иванов и др., 2008].

Для листьев *L. ovata* характерен гомогенный тип строения мезофилла. У изученных ценопопуляций тайника выявлено отсутствие достоверных отличий по толщине листа. При этом свойства субстрата разнонаправленно влияли на толщину мезофилла и эпидермиса: более толстый эпидермис и меньшая толщина мезофилла были характерны для растений с участка чистой золы. Данный факт, вероятно, связан с увеличением запыленности атмосферного воздуха на отвалах и является защитно-приспособительной реакцией.

У растений тайника из исследованных местообитаний различий по размерам и количеству клеток мезофилла в единице площади листа не обнаружено. Вместе с тем, у растений с золоотвала показано достоверное увеличение количества хлоропластов в клетке мезофилла, а также, как следствие, увеличение числа пластид в единице площади листа (на нерекультивированном участке). Вероятно, это можно расценивать как компенсаторную адаптивную реакцию.

При этом свойства субстрата не оказывали существенного влияния на размеры пластид. Это еще раз подтверждает известные факты о том, что объемы хлоропластов у растений достаточно стабильны и мало подвержены фенотипическим изменениям [Мокроносов, 1978].

Клеточный объем хлоропласта (КОХ) – это показатель, указывающий на размер клеточного объема, который обеспечивается метаболитами, а также субстратами дыхания и АТФ, за счет деятельности одного хлоропласта. Обнаружено достоверное снижение данного показателя у *L. ovata* с обоих участков золоотвала, по сравнению с естественным фитоценозом. Эта закономерность для растений, произрастающих на техногенных субстратах, объяс-

няется увеличением в их клетках числа хлоропластов, в то время как объемы клеток практически не изменялись.

Такие интегральные показатели фотосинтетического аппарата листа как суммарная площадь поверхности наружных мембран хлоропластов и индекс проективной поверхности хлоропластов (ИМХ, ИПХ) обнаруживают положительную корреляцию с интенсивностью фотосинтеза.

Показатель ИМХ изменялся аналогично изменению числа хлоропластов в расчете на единицу площади: наибольший ИМХ имели листья растений тайника с нерекультивированного участка золоотвала. Очевидно, этот факт связан с достоверным увеличением числа пластид в клетке мезофилла у растений данных ценопопуляций.

Согласно А.Т. Мокроносову, значения ИПХ в пределах от 1 до 4 являются оптимальными для большинства растений, поскольку обеспечивают наилучшие условия для светопоглощающего экрана листа. Для видов растений, обитающих в условиях сильного затенения, этот индекс меньше единицы [Мокроносов, 1978]. Наибольшая величина данного показателя обнаружена у растений тайника с нерекультивированного участка. Таким образом, большее развитие внутренней ассимиляционной поверхности листа у растений, обитающих на золоотвале, по-видимому, связано с меньшими значениями сомкнутости крон и общего проективного покрытия, и, как следствие, большей освещенностью на данном участке.

Таблица

Параметры мезоструктуры листа *L. ovata* из естественного (участок 1) и техногенно нарушенных (участок 2 и 3) местообитаний

Параметры	Участок 1	Участок 2	Участок 3
Толщина листа, мкм	510.2 ± 6.2 a	498.1 ± 7.8 a	511.9 ± 11.3 a
Толщина эпидермиса, мкм	88.1 ± 2.0 a	98.2 ± 2.3 b	102.89 ± 2.6 bc
Толщина мезофилла, мкм	422.1 ± 5.5 a	399.9 ± 6.7 b	409.0 ± 9.9 ab
УППЛ, мг/дм ²	292.8 ± 5.8 a	262.4 ± 5.2 b	236.2 ± 7.3 c
Количество клеток мезофилла, тыс/см ²	56.5 ± 1.0 a	57.5 ± 1.1 a	50.4 ± 1.6 b
Объем клетки мезофилла, тыс. мкм ³	101.3 ± 3.7 a	105.5 ± 3.6 ab	94.3 ± 3.0 ac
Количество хлоропластов в клетке, шт	44 ± 1 a	54 ± 2 b	50 ± 2 c
Количество хлоропластов, 10 ⁶ /см ²	2.5 ± 0.1 a	3.1 ± 0.1 b	2.5 ± 0.1 a
Объем хлоропласта в клетке мезофилла, мкм ³	77.8 ± 2.6 a	83.5 ± 3.4 a	81.5 ± 2.7 a
КОХ, мкм ³	2311.8 ± 84.3 a	1955.2 ± 66.2 b	1876.1 ± 60.1 c
ИМХ, см ² /см ²	2.2 ± 0.0 a	2.8 ± 0.1 b	2.3 ± 0.1 a
ИПХ, см ² /см ²	0.6 ± 0.01 a	0.8 ± 0.02 b	0.6 ± 0.01 a

Таким образом, проведенное исследование, направленное на выявление адаптивных особенностей орхидеи *Listera ovata*, расширяет представления о структурных перестройках, помогающим растениям выживать в неблагоприятных условиях трансформированных экосистем. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что натурализации *L. ovata* на техногенных субстратах (золоотвал) способствовали такие адаптивные изменения анатомо-морфологических параметров как увеличение толщины эпидермиса, числа хлоропластов в клетке и единице площади листа, а также увеличение внутренней ассимилирующей поверхности.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Свердловской области в рамках научного проекта № 20-44-660011, а также Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 02.А03.21.0006).

Литература

- Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. 437 с.
- Иванов Л.А., Ронжина Д.А., Иванова Л.А. Изменение листовых параметров как показатель смены функциональных типов степных растений вдоль градиента аридности // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 3. С. 1–8.
- Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы. Екатеринбург: ООО «Мир», 2018. 450 с.
- Мамаев С.А., Князев М.С., Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Орхидные Урала: систематика, биология, охрана. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 124 с.
- Мокронос А.Т. Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата // Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата. Свердловск, 1978. С. 3–17.
- Мокронос А.Т., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М.: Academia, 2006. 445 с.
- Филимонова Е.И., Лукина Н.В., Глазырина М.А. Орхидные на нарушенных промышленностью землях Урала // Экология и география растений и растительных сообществ: Материалы VI Международной научной конференции. Екатеринбург, 2018. С. 986–991.
- Чибрик Т.С., Лукина Н.В., Филимонова Е.И., Глазырина М.А. Экологические основы и опыт биологической рекультивации нарушенных промышленностью земель. Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2011. 268 с.
- Brzosko E. The dynamics of *Listera ovata* populations on mineral islands in the Biebrza National Park // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 2002. V. 71(3). P. 243–251.
- Brys R., Jacquemyn H., Hermy M. Pollination efficiency and reproductive patterns in relation to local plant density, population size, and floral display in the rewarding *Listera ovata* (Orchidaceae) // Botanical Journal of the Linnean Society. 2008. V. 157(4). P. 713–721.
- Filimonova E., Lukina N., Glazyrina M., Borisova G., Tripti, Kumar A., Maleva M. A comparative study of *Epipactis atrorubens* in two different forest communities of the Middle Urals, Russia // Journal of Forestry Research. 2019. DOI: 10.1007/s11676-019-01010-y
- Jurkiewicz A., Turnau K., Mesjasz-Przybylowicz J., Przybylowicz W., Godzik B. Heavy metal localisation in mycorrhizas of *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (Orchidaceae) from zinc mine tailings // Protoplasma. 2001. V. 218. P. 117–124.
- Shefferson R., Kull T., Tali K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills // American Journal of Botany. 2008. V. 95(2). P. 156–164.
- Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. Orchids of Russia and adjacent countries (within the border of the former USSR). A.R.G. Gantner Verlag K.G. Königstein, 2008. 690 p.
- Van Arendonk J.J.C.M., Poorter H. The Chemical Composition and Anatomical Structure of Leaves of Grass Species Differing in Relative Growth Rate // Plant, Cell Environment. 1994. V. 17. P. 963–970.
- Wiegand K. M. A. Revision of the Genus *Listera* // Bulletin of the Torrey Botanical Club. 1899. V. 26(4). P. 157–171.