ВСЕРОССИЙСКИЙ МОЛОДЕЖНЫЙ КОНКУРС ПО ПРОБЛЕМАМ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ, ЭКОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

«ЮНЭКО»

Направление: Биология

Тема: «Фенотипический полиморфизм клевера белого ползучего в условиях с различной антропогенной нагрузкой в окрестностях села Горнозаводска»

Соискатель: Коротеева Маргарита Андреевна

Научный руководитель: Сабакова Маргарита Олеговна

Место выполнения работы: Муниципальное бюджетное образовательное учреждение «Средняя общеобразовательная школа с Горнозаводска Невельского района Сахалинской области»

2025

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……...3
1. Характеристика полиморфизма Trifolium repens(L.) как природного биоиндикатора антропогенной нагрузки…….4
1.1. Морфологические и биологические особенности Trifolium repens (L.) клевера белого……....4
1.2. Возможности использования клевера белого (Trifolium repens L.) для биоиндикации антропогенного нарушения среды……....5
2. Фенотипический полиморфизм в популяциях Trifolium repens, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки территорий в с.Горнозаводска…….…..6
2.1. Характеристика района исследования……6
2.2. Описание пробных площадок……7
2.3. Материалы и методы исследования……7
2.4 Результаты исследования……9
Заключение…… 11
Список литературы ……..……12
Приложения……..13-15.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений интегральной оценки качества окружающей среды является использование показателей состояния живых организмов, характеризующие стабильность их развития или отклонение от нормы. Такими показателями являются феногенетические изменения или полиморфизм у клевера белого (ползучего) (Ttifolliumrepens L.), признанного наиболее информативным и повсеместно распространенным маркером.

Повсеместное присутствие популяций клевера белого, испытывающих в условиях урбоценозов рекреационное влияние, а также наличие стресс-реакций на изменяющиеся условия среды у этого растения определили его широкое применение в качестве фитоиндикатора состояния окружающей среды.

Актуальность исследования

Актуальность темы исследования обусловлена тем, что получение объективной картины экологического состояния конкретной локации в условиях комплексного воздействия природных н антропогенных факторов основывается на применении интегрированных методов, в число которых входит и метод биоиндикации. Традиционно применяемые физико-химические методы эффективно дополняются достаточно чувствительным и относительно доступным методом биоиндикации. В данной связи особую роль играет поиск повсеместно распространенных растений-природных биоиндикаторов, позволяющих достоверно оценивать экологическое состояние окружающей среды и степень воздействия на нее антропогенных факторов.

Объект исследования– Trifoliumrepens (L.) – клевер белый.

Предмет исследования – фенотипический полиморфизм по признаку «седого пятна» клевера белого как биоиндикатор антропогенной нагрузки.

Цель работы – изучение полиморфизма в популяциях белого ползучего клевера, произрастающего в условиях с различной антропогенной нагрузкой в окрестностях с. Горнозаводска, как биоиндикатора антропогенной нагрузки на окружающую среду.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

– рассмотреть морфологические и биологические особенности Trifoliumrepens (L.) – Клевера белого;

– определить возможности использования клевера белого (Trifoliumrepens L.) для биоиндикации антропогенного нарушения среды;

– определить методику биоиндикации состояния окружающей среды по частотам встречаемости фенов белого клевера;

– выявить фенотипический полиморфизм в популяциях Trifoliumrepens, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки территорий в с. Горнозаводска.

Гипотеза исследования: наибольшее количество экземпляров с признаками фенотипического полиморфизма «седое пятно» будет встречаться в локациях с более высокой антропогенной нагрузки.

Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА TRIFOLIUM REPENS (L.) КАК ПРИРОДНОГО БИОИНДИКАТОРА АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

1.1 Морфологические и биологические особенности Trifoliumrepens (L.) – Клевера белого

Клевер белый (TrifoliumrepensL.) (рис. 1) – двулетнее или многолетнее травянистое перекрестноопыляемое (энтомофильное) растение семейства бобовых (Leguminosae), представлен диплоидными формами (2n=14) и экспериментально полученными тетраплоидами (4n=28)[7, с. 474].

Стебли куста клевера – это ветви укороченного главного стебля растения (оси первого порядка), из пазух листьев которого отходят боковые ветви (оси второго порядка) и т.д., тем самым создавая сложную архитектуру строения растения.

Листья клевера сложные, тройчатые, с беловатым пятном в виде треугольника, от яйцевидной до элептической формы, опушенные. Окраска изменяется от светло-зеленой до темно-зеленой. Прилистники пленчатые, с зелеными или фиолетовыми жилками [6, с. 73] (Приложение 1)

Цветки клевера мелкие, обоеполые, собраны в соцветие головка. Пятилепестной цветок состоит из верхнего лепестка – паруса, двух боковых лепестков - весел и двух нижних лепестков, образующих лодочку. Цветочные головки шаровидной или широкоцилиндрической формы с длиной соцветия от 16 до 45 мм и шириной от 6 до 35 мм, окруженные прилистниками, состоящими из двух сидячих листочков. Количество соцветий на одном растении колеблется от 6 до 100, число цветков в одном соцветии – от 35 до 170 в зависимости от условий выращивания [5, с. 38].

Плод у клевера белого– боб, обычно односемянный, иногда двусемянный, яйцевидной формы. В зависимости от сортовых и погодных условий двусемянность варьирует от 0,4 до 20,5 % [3, с. 40].

Корневая система у растений клевера белого позднеспелого типа –стержневато-мочковатая, у раннеспелого – стержневая, с богато разветвленной системой боковых корней, на которых находятся клубеньки, способные усваивать азот прямо из воздуха, обогащая тем самым почву. На позднеспелом клевере клубеньков образуется больше, чем на раннеспелом и их максимальное количество достигается к началу цветения. Корни проникают на глубину до 2,0-2,5 м, распространяясь в стороны до 0,6 м. Основная масса корней находится в 10-20 см слое почвы (73-77 %) [7, с. 479].

По своим биологическим особенностям клевер белый является довольно пластичным растением. Под влиянием внешней среды и деятельности человека он способен изменять свои исходные качества и приспосабливаться к условию того или иного района возделывания.

Клевер белый хорошо растет, нормально развивается и дает высокий урожай сена и семян при достаточном количестве тепла, света, воды и питательных веществ. Все эти условия одинаково важны для роста и развития растений клевера.

Клевер белый требователен к воде, но избытка ее не переносит и при застое воды гибнет. Лучше всего он растет и развивается при влажности почвы около 70-80% от полной влагоемкости. Он требует большого количества влаги в почве уже в первый год жизни, когда находится под покровным растением. Если в этот период растения удовлетворены влагой, то клевер развивается хорошо и гибель всходов бывает небольшая. Потребность клевера во влаге в последующие годы растет с накоплением укосной массы, а после скашивания она увеличивается по мере отрастания.

Количество тепла, необходимое для нормального роста и развития растений, неодинаково у разных типов клевера. Клевер белый плохо переносит бедные, сильно кислые и засоленные почвы,

поэтому на таких почвах травостой сильно изреживается. Клевер отзывчив на высокое содержание в почве фосфора, калия и кальция. Клевер белый, как бобовое растение, имеет фундаментальное значение для устойчивого развития полевого и лугопастбищного кормопроизводства, биологизации земледелия, повышения плодородия почв, заготовки различных видов кормов.

1.2 Возможности использования клевера белого (Trifoliumrepens L.) для биоиндикации антропогенного нарушения среды

По сложившемуся мнению, современных экологов, клевер белый полностью соответствуетбольшей части требований к идеальному биологическому индикатору. Клевер благополучно существует рядом с человеком даже на территориях, подвергшихся значительному антропогенному воздействию. Под воздействием антропогенных факторов в популяциях увеличивается частота встречаемости специфических фенотипов у различных видов растений и животных. В частности, форма «седого» рисунка на пластинках листа Trifoliumrepens и частота встречаемости листьев, имеющих рисунок, может использоваться как индикатор загрязнения среды. В представленном исследовании Т.А. Горшковой на участках под ЛЭП и в контроле среднее значение относительного количества листьев с «седым» рисунком не превышало 17 %, что считается нормой.

Клевер благополучно существует рядом с человеком даже на территориях, подвергшихся значительному антропогенному воздействию, что служит убедительным доказательством его более высокой устойчивости к различным неблагоприятным факторам по сравнению с другими типичными лесными или луговыми видами растений. Таким образом клевер белый – это признанный синантроп, т.е. растение, образ жизни которого связан с человеком, его жильем, а также с созданным или видоизмененным им ландшафтом.

Оценить состояние окружающей среды и уровень антропогенного воздействия можно с помощью фенотипических биоиндикаторов.

Фены – это четко различающиеся варианты какого-либо признака или свойства биологического вида.

Под воздействием антропогенных факторов в популяциях увеличивается частота встречаемости специфических фенотипов у различных видов растений и животных. Таким образом, частота встречаемости некоторых фенов является биологическим индикатором воздействия антропогенных факторов, в том числе загрязнения.

Как мы уже выяснили, практические исследования современных экологов [2, 4, 6] доказывают, что в качестве фенотипического биоиндикатора можно использовать широко распространенный белый клевер Trifoliumrepens (клевер ползучий). (Приложение 1)

Согласно методике Т.Я. Ашихминой [1] наблюдения осуществляются путем подсчета форм с различным рисунком и без него (рис. 2) и последующего расчета частоты их встречаемости в процентах(Приложение1)

Глава 2 ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ В ПОПУЛЯЦИЯХ TRIFOLIUMREPENS, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ ТЕРРИТОРИЙ В с. Горнозаводска

2.1 Характеристика района исследования

Село Горнозаводск в Сахалинской области расположено на округе с умеренным муссонным климатом, для которого характерны прохладное лето и влажная зима, с вероятностью тайфунов в конце лета. Среднегодовая температура воздуха в Горнозаводске составляет +0,9°C, а относительная влажность воздуха — 73,2%. Рельеф местности, вероятно, холмистый, так как село находится в Невельском районе и относится к зоне хвойных лесов, где в долинах рек встречаются лиственные породы деревьев**.** например, из тополя, ивы и ольхи. На отдельных вершинах преобладают заросли из кедрового и ольхового стланика. В покрове смешанных лесов различные виды папоротников, триллиум камчатский, аралия сердцевидная и др. Пойменные леса состоят в основном из ивы удской, тополя Максимовича; на заболоченных участках растёт ясень маньчжурский. Увлажнённые участки пологих склонов, их подножия и долины рек заняты крупнотравьем – растительной группировкой, состоящей из дудника медвежьего, лабазника камчатского, крапивы плосколистной, бодяка камчатского, высота которых обычно достигает 2-3 м. На возвышенных участках распространены каменноберезняки, часто с густыми и высокорослыми бамбучниками. На склонах у берега моря местами встречаются редкостойные дубняки из дуба курчавого, но их распространение ограничено небольшими площадями.

2.2 Описание пробных площадок

Пробы были взяты на четырех площадках с разной антропогенной нагрузкой.

Площадка №1 склон горнолыжной базы

Почва на данном участке глинистая с небольшими примесями песка и горных пород, на которой растут небольшое количество горных растений, господствующими видами являются сам C. sibirica, клубника – Fragariaviridis, подорожник Комарова – Plantagokomarovii, полынь шелковистая – Artemisia sericea, клевер белый ползучий (*Trifolium repens* L.). Данная площадка с малым антропогенным воздействием.

Площадка №2 окраина села Горнозаводска.

Участок с самым низким антропогенным воздействием. Почва плодородная, так как степь находится на границе с лесом. На ее территории находится большое количества чернозема. Растительность разнообразная, но преобладают злаковые.

Площадка №3 центр села Горнозаводска.

Площадка находится вблизи с автомобильной дорогой, что значит большое количество выхлопных газов. Почва на участке песчаная, не плодородная. Растения, на данной территории подвержены вытаптыванию людьми. Произрастают в основном сорные растения, такие как: подорожник большой (*Plantagomajor*), тысячелистник обыкновенный, одуванчик (*Taraxacum).* Место, с высоким антропогенным воздействием.

Площадка №4 левый берег реки Лопатинка.

Почва на участке песчаная. Самая благоприятная территория для произрастания растений. Высоких деревьев по берегу не растет, солнечного света достаточно. Обильно представлены следующие виды: тимофеевка луговая – Pleumpretense, вероника дубравная – Veronicachamaeedrys, душица обыкновенная – Origanumvulgare. Вытаптыванию людьми и скотом не подвергается.

2.3 Материалы и методы исследования

Наличие «седого» пятна на листьях растений T. repens связано с нарушением нормального развития хлорофилла в полисадных клетках листа. Наследственный характер таких нарушений был доказано для клевера на молекулярно-генетическом уровне с применением методов полимеразно-цепной реакции. Данный признак генетически детерминирован и определяется действием серии множественных аллелей гена V. Дж. Л.Брюбейкер насчитывал более 11 аллелей этого гена. Члены серии состоят в различных отношениях друг сдругом по степени доминирования. Аллель vрецессивна по отношению ко всем остальным аллелям: V, V^H, V^B, $_PV^{Bh}$, V^P, V^F, V^Sи т. д. Аллель V^Bдоминирует над V^P, поэтому рисунки у генотипов V^BV^Pи V^BV^Bодинаковы. Но чаще они действуют как неоморфы и в компаунде дают продукты обеих аллелей, поэтому в фенотипе проявляются пятна обоих доминантных аллелей, например, генотип Vvимеет фенотип B, а VBhv- фенотип BH, но в компаунде $V^{Bh}V^B$обнаруживается новый рисунок с фенотипом BB^H (Приложение 2)

Целью нашей работы был сравнительный анализ внутри- и межпопуляционной изменчивости клевера ползучего по признаку наличие и разнообразие формы «седого» пятна на листьях растений в различных экологических условиях: на территории и в окрестностях с. Горнозаводска.

Сбор растительного материала проводили на газонах в с. Горнозаводска и по обочинам дорог (в окрестностях села). Для идентификации фенотипов брали листья растений на расстоянии 0,5-5 метров друг от друга. При анализе образцов растений клевера использовали таблицу, предложенную Дж. Л. Брюбейкером в 1966 г. В ней представлены 8 наиболее часто встречающихся аллелей гена V и 36 вариантов их взаимодействия в компаунде (табл. 2 Приложение3).

Сбор растительного материала проводили в период обильного цветения клевера (май-июль). Исследовано четыре популяций. Всего было собрано и проанализировано 298 образцов растений. Обнаружено 19 комбинаций мутантных аллелей в гомо- и гетерозиготе из 36 в соответствии с методикой П. Я. Шварцмана (рис. 1, [7]). Точный генотип не установлен у 1-2% растений.

2.4 Результаты исследования

Во всех исследованных локациях наблюдается преобладание растений без рисунка на листьях, т.е. рецессивных гомозигот (vv) – 22-38%. Высокая частота встречаемости компаундов: VPVBh (от 8,2 до 17.6%) и VPVH (от 3 до 9.2%); гомозигот: VHVH (от 5,7 до 13%), VSVS (от 3,4 до 9.2%), VV (от 5 до 8%) и гетерозиготы Vv (от 5,4 до 10.6%, рис. 3).

Рисунок 3

Наиболее часто встречающиеся варианты взаимодействия множественных аллелей гена V, определяющего рисунок «седого» пятна на (*Trifolium repens* L.)

Реже встречаются растения с генотипами VBVB - (3-7%); VBv - (2-4.6%), VPv - (1.5-6%), VPV - (1.5-4.8%), VPVP - (3.5-6%), VBhv - (1.5-4%), VHVB - (0.7-3.9%), VHv - (0.5-2.6%), и VBhVBh - (1.1-2.3%). Меньше одного процента частота встречаемости растений с генотипами: VBhV, VHV, VFVF, VSVH и VSVP (рис. 5).

Рисунок 5 – Редко встречающиеся варианты взаимодействия множественных аллелей гена V, определяющего рисунок «седого» пятна на листьях *Trifolium repens L.*

Растения с генотипом $V^{Bh}V$встречаются с частотой 0,5-2,3%; с генотипом V^FV^F- 0,5-1% – обнаружены только в локациях возле реки Лопатинки; V^SV^P- с частотой 1,2-1,6% – обнаружены только на луге села

В с. Горнозаводск и его окрестностях – на территориях, загрязненных выхлопными газами дорог, характерна тенденция повышения полиморфизма – обнаружено 10-12 генотипов.

Сравним полученные данные и рассмотрим среднюю частоту встречаемости разных генотипов по исследованию признака рисунок листа растений *Trifolium repens* L. (приложение 3)

Характерной особенностью (*Trifolium repens* L.) является то, что он очень хорошо адаптируется к широкому диапазону абиотических условий, устойчив к вытаптыванию. В природных популяциях (*Trifolium repens* L.) осуществляется движущий отбор, направленный на повышение частоты встречаемости отдельных генотипов. Причиной этому могут служить антропогенные воздействия на среду или отклонения от нормы экологических факторов: режима освещения, открытости пространства опылителям, значения влажности и температуры воздуха во время роста листьев и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбор объекта исследования был обусловлен тем, что клевер ползучий, являясь синантропом. Характерной особенностью T. repens является то, что он очень хорошо адаптируется к широкому диапазону абиотических условий, устойчив к вытаптыванию.

Рассматривая соотношение обнаруженных морф, мы получили возможность подтвердить выдвинутую гипотезу и сделать следующие выводы:

1.На площадках прослеживалось доминирование морфы №1 (51% и 60%), особенностью которой было отсутствие «седины». Остальные морфы были распределены неравномерно и значительно различались по количеству представленных особей. Но это все равно позволило сделать вывод о степени антропогенного влияния, т.к. количество мутантных генотипов в совокупности составило на разных площадках 49% и 40% соответственно.

2. Площадка №3 расположена в самом центре села, она является местом регулярного посещения жителей, отдыха молодежи. Можно предположить, но не все гости парка придерживаются отведенных дорожек, подвергая газонную растительность вытаптыванию, что не может не накладывать своего отпечатка на генотипы и фенотипы растений.

3.Площадка №2 напротив, находится в отдалении от жилых домов, представляя собой участок "дикой" природы. Посещения людей и их антропогенное воздействие не носит систематического характера, на что и указывает наличие мутантных форм. Вероятно, подобное вызвано вытаптыванием популяции, произрастающей на обочинах протоптанных тропинок.

4.Явное преобладание конкретной морфы, и неравномерность их распределения могут говорить об антропогенном воздействии на данных территориях. Ответной реакцией на которое и являются перечисленные особенности, зависящие от степени этой нагрузки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ И ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Ашихмина, Т.Я.** Экологический мониторинг: учебно-методическое пособие. / Т.Я. Ашихмина. Изд. 3-е, испр. и доп. – М.: Академический Проект, 2006. – 416 с.

2. **Горшкова, Т.А.** Оценка возможности использования клевера ползучего (Trifoliumrepens L.) для биоиндикации антропогенного нарушения среды / Т.А. Горшкова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 69-73.

3. **Денисова, Л.Н.** Пространственная и возрастная структура популяций Trifoliumrepens (Fabaceae) в различных местообитаниях / Л.Н. Денисова // Ботанический журнал. – 1995. – № 4. – С. 38-42.

4. **Левицкий, С. Н.** Генетический полиморфизм в популяциях Trifoliumrepens, произрастающих в условиях различной антропогенной нагрузки территорий / С. Н. Левицкий // Фундаментальные исследования. – 2013. – №4-1. – С. 108-111.

5. **Чукаева, Н.В.** Белый клевер в оценке состояния окружающей. среды // Естествознание и гуманизм. Сборник научных трудов. – 2010. – Т. 6, № 1. – С. 73-81

6. **Шварцман, П.Я.** Полевая практика по генетике с основами селекции / П.Я. Шварцман. – М.: Просвещение, 2016. – 142 с.

7. **Trifoliumrepens L.**– Клевер ползучий, или белый / И.А. Губанов и др. // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. – М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2003. – Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). – С. 473-479.

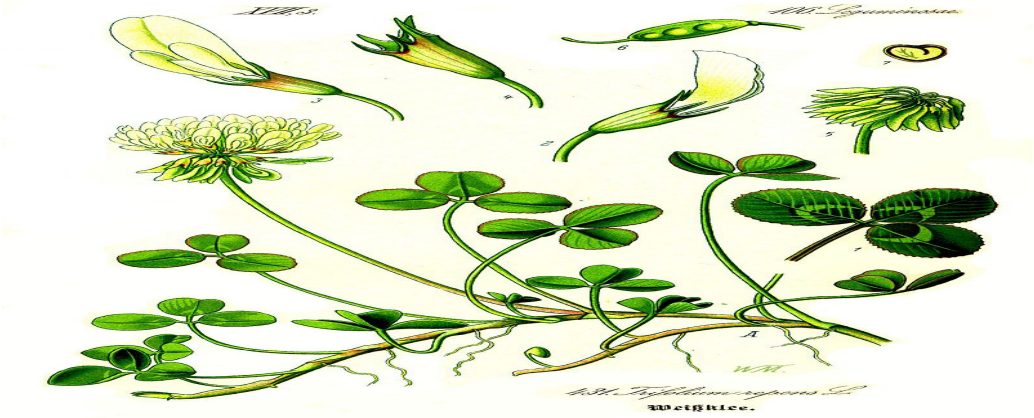

Рисунок 1 – Trifoliumrepens (L.) Клевер белый (ползучий) [20, с. 473]

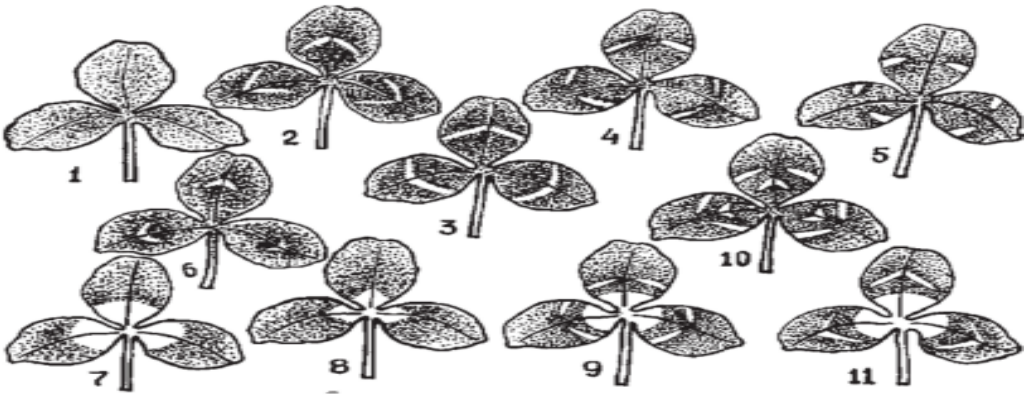

Рисунок 2 – Фенотипы клевера белого [1, с. 118]

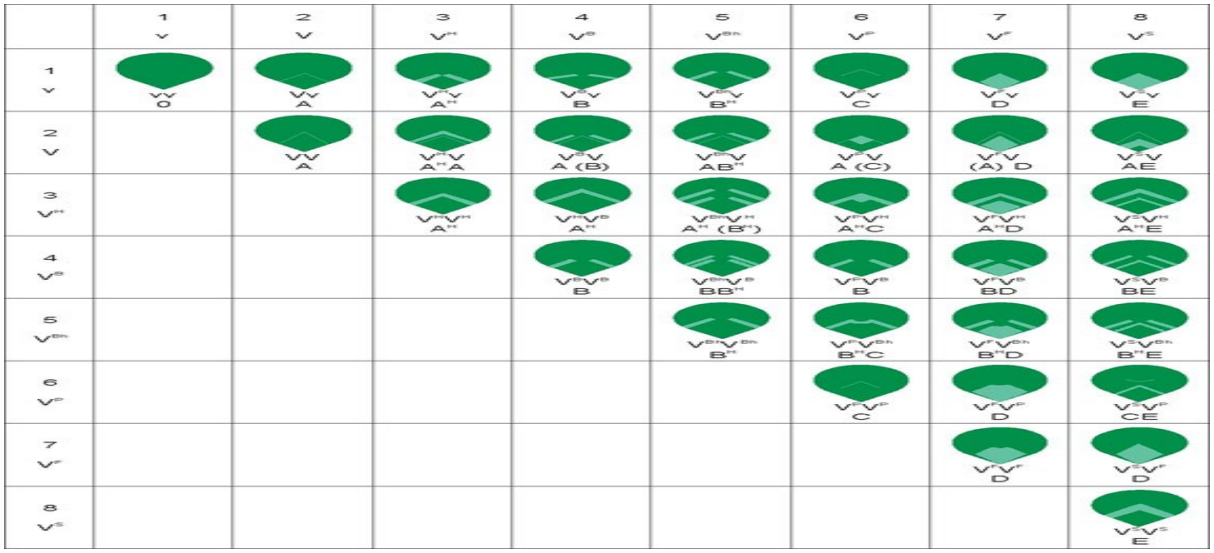

Рисунок 3 – Гомо- и гетерозиготы (компаунды) по аллелям гена V, определяющего рисунок «седого» пятна на листьях T. repens.

Приложения 2

Таблица 1

Генетическая детерминация разнообразия формы «седых» пятен на листьях клевера ползучего

Аллель	Фенотип	Символ фенотипа (фен)
v	Пятно отсутствует	O
V	Полное пятно	A
V^H	Полное пятно, высокое	$A^н$
V^B	Разорванное пятно	B
V^{Bh}	Разорванное высокое	$B^н$
V^P	Центральная верхняя точка	C
V^F	Большое сплошное пятно у основания	D
V^S	Низкое треугольное пятно у основания	E

Приложение 3

Таблица 2

Средняя частота встречаемости(*Trifolium repens* L.) разных генотипов (%) по признаку седого пятна у растений в исследованных популяциях.Н. В. Глотов [4]

vv	48.1	46.6	29.85	33
Vv	-	-	6.6	9.4
VV	1.1	0.9	6.2	5.7
VHv	-	-	1.5	1.0
VHVH	1.9	2.1	8.4	10
VBv	3.2	4.9	3.3	3.0
VHVB	2.2	3.0	2.1	1.7
VBVB	-	-	4.2	4.8
VBhv	-	-	1.4	0.5
VBhVBh	-	-	1.0	1.7
VPv	1.0	1.4	3.2	2.3
VPV	7.9	5.3	3.0	2.3
VPVH	13.3	10.8	5.1	3.1
VPVBh	14.4	17.3	11.7	9.3
VPVP	2.4	1.6	2.3	3.7
VFVF	-	-	0.5	0.5
VSVP	-	-	0.75	0.8
VSVS	1.4	1.2	5.3	5.3
VBhV	-	-	2.2	1.5
V*	2.0	0.9	1.7	0.8