

На правах рукописи



Шималина Надежда Сергеевна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *PLANTAGO MAJOR* L. ИЗ ЗОН
РАДИОАКТИВНОГО И ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

Специальность 03.02.08 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Позолотина Вера Николаевна**

Официальные оппоненты: **Гераськин Станислав Алексеевич** – доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», заведующий лабораторией радиобиологии и экотоксикологии растений

Малева Мария Георгиевна – кандидат биологических наук, ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

Защита состоится 24 ноября 2020 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений и животных УрО РАН, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202.

Факс: (343) 260-82-56, e-mail: dissovet@ipae.uran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института экологии растений и животных УрО РАН, <http://ipae.uran.ru/>.

Автореферат разослан « » сентября 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Золотарева Наталья Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в разных регионах планеты существуют обширные территории, загрязненные выбросами промышленных предприятий как в ходе их штатной работы, так и в результате аварий. Экологические последствия загрязнения проявляются в двух аспектах: с одной стороны, токсиканты, попадая в природные экосистемы, воздействуют на живые организмы, с другой стороны, они включаются в биогеохимические циклы и накапливаются в продукции лесного, водного, сельского хозяйства. Актуальность исследования природных сообществ в зонах техногенного загрязнения высока, огромные территории уже загрязнены, и нет гарантий, что ситуация улучшится в будущем, поскольку все промышленные отрасли, включая ядерную, активно развиваются.

Импактные территории могут использоваться в качестве уникальных полигонов для решения многих фундаментальных проблем экологии, связанных с изучением сильных внешних воздействий на биоту (Алексахин, 2006; Воробейчик, Козлов, 2012; Suter, 2008; Geras'kin et al., 2011; Bréchnignac et al., 2016), а также для создания научной базы, необходимой для разработки нормативных документов в области экологической безопасности (Крышев, Сазыкина, 2018; UNSCEAR, 2008; IAEA, 2011; ICRP, 2008, 2014). Для Уральского региона эта проблема особенно актуальна, поскольку здесь расположены крупные промышленные объекты, деятельность которых привела к формированию зон загрязнения радионуклидами и тяжелыми металлами (Экологические последствия..., 1993; Кайгородова и др., 2012; Воробейчик и др., 2019; Mikhailovskaya, Pozolotina, 2020). В настоящей работе выбраны следующие районы исследования: Восточно-Уральский радиоактивный след (ВУРС) и зона влияния Карабашского медеплавильного завода (КМЗ).

Степень разработанности проблемы. В многочисленных экспериментальных работах, выполненных на молекулярном, клеточном и организменном уровнях, хорошо изучены основные ответные реакции растений на действие ионизирующих излучений (Савин, 1981, Гродзинский, 1989; Москалев, Шапошников, 2009; Esnault et al., 2010; De Micco et al., 2011; Gudkov et al., 2019) и тяжелых металлов (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989; Титов и др., 2007, 2014; Sharma, Agrawal, 2005; Clemens, 2006; Zvereva et al., 2010). Однако закономерности острого воздействия невозможно корректно экстраполировать на области малых доз и концентраций, есть принципиальные различия в механизмах действия (Кузин, 1991; Calabrese, Blain, 2009; Volkova et al., 2018; 2020; Duarte et al., 2019; Gudkov et al.,

2019). Кроме того, в природных экосистемах на живые организмы воздействует вся совокупность факторов окружающей среды, включая техногенный, при этом наблюдаются синергические, антагонистические и аддитивные эффекты (Черненкова, 2002; Позолотина, 2003; Гераськин и др., 2010, 2016; Петин и др., 2012; Pozolotina, Antonova, 2017; Caplin, Willey, 2018).

Растения ведут прикрепленный образ жизни, поэтому не могут избежать хронического действия стрессовых факторов. Можно предполагать, что каждая популяция, испытывающая пролонгированное действие тяжелых металлов или ионизирующей радиации, пройдя многие этапы отбора, приобретает специфические черты (Безель и др., 2001; Чиркова, 2002; Pozolotina et al., 2012). При значительном количестве исследований, посвященных изучению влияния ионизирующего излучения (Esnault et al., 2010; Møller, Mousseau, 2015; Volkova et al., 2018; Caplin, Willey, 2018) и тяжелых металлов (Безель, 2006; Титов и др., 2014; Zvereva et al., 2010; Sharma, Agrawal, 2005; Fischer et al., 2013; Dulya, Mikryukov, 2016) на природные популяции растений, работ по сравнению биологических эффектов в зонах влияния различных по природе факторов немного (Позолотина и др., 2016; Медведева, Болсуновский, 2016; Pozolotina et al., 2012). Еще меньше исследований сочетанного действия разных поллютантов на популяции и экосистемы (Евсеева и др., 2008; Rybak et al., 2018). Фундаментальные задачи таких исследований связаны с изучением многообразия эколого-генетических особенностей видов растений в условиях стресса и механизмов адаптивного ответа, обеспечивающих стабильное существование ценопопуляций в условиях разных типов техногенных загрязнений.

Одним из способов оценки состояния популяций растений является изучение жизнеспособности их семенного потомства, поскольку полноценное репродуктивное воспроизводство – это наиболее чувствительный и важный период онтогенеза, поддерживающий развитие популяций и экосистем во времени и пространстве (Попова и др., 1992; Сох, 1992; Pozolotina et al., 2012).

Важную роль в устойчивости растений к техногенному стрессу играют антиоксидантные системы, поскольку и тяжелые металлы, и ионизирующая радиация способны индуцировать образование активных форм кислорода и модифицировать активность ферментов (Храмова и др., 2006; Sharma et al., 2012; Morozova et al., 2016; Volkova et al., 2017; Gudkov et al., 2019). Задача по выявлению различий про- и антиоксидантного статуса у растений из зон радиоактивного и химического загрязнения представляется актуальной, так как ионизирующие

излучения и тяжелые металлы имеют разные механизмы взаимодействия с биотой на молекулярно-клеточном уровне.

В ряде работ показано, что стрессовые воздействия могут приводить к изменению генетической структуры природных популяций растений, при этом может наблюдаться как снижение, так и увеличение генетической изменчивости (Шевченко, Померанцева, 1985, Хедрик, 2003, Алтухов, 2004; Dulya, Mikryukov, 2016; Kazakova et al., 2018). В связи с этим, актуальной является сравнительная оценка генетического разнообразия растений в зонах радиоактивного и химического загрязнения. Анализ микросателлитных локусов (SSR) широко используется в популяционной генетике для решения подобных задач и характеризуется высокой разрешающей способностью (Jarne, Lagoda, 1996).

Цель диссертационной работы: сравнительный анализ экологических, генетических и биохимических особенностей подорожника большого (*Plantago major* L.) из зон радиоактивного и химического загрязнения.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. определить мощности поглощенных доз ионизирующих излучений в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа и уровни токсических нагрузок в зоне влияния Карабашского медеплавильного завода для материнских растений *P. major*;
2. проанализировать внутри- и межпопуляционную изменчивость жизнеспособности семенного потомства *P. major*, сформировавшегося в зонах радиоактивного и химического загрязнения, а также на фоновых территориях;
3. оценить адаптивный потенциал семенного потомства *P. major* из разных зон к «привычному» и «новому» стрессовым факторам с помощью провокационного воздействия острого γ -облучения и загрязненной тяжелыми металлами почвы;
4. сравнить про- и антиоксидантный статус семенного потомства *P. major* из разных зон;
5. выполнить анализ изменчивости микросателлитных локусов в ценопопуляциях *P. major* из разных зон.

Научная новизна. Впервые проведено синхронное исследование изменчивости жизнеспособности, радио- и металлоустойчивости семенного потомства *P. major* из близко расположенных зон с разными типами техногенного загрязнения: радиоактивного (ВУРС) и химического (зона влияния КМЗ) в сравнении с фоновыми выборками. Впервые изучено состояние про- и антиоксидантных систем проростков *P. major*, родительские растения которых испытывали хронический радиационный или токсический стресс, в сравнении с

фоновыми выборками. Впервые выполнен анализ изменчивости микросателлитных локусов в ценопопуляциях *P. major* из зон радиоактивного и химического загрязнения, а также с фоновых территорий.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о влиянии радиоактивного и химического загрязнения окружающей среды на генеративное воспроизводство, особенности функционирования антиоксидантных систем и генетическое разнообразие растений. Результаты работы могут быть использованы при проведении мониторинговых исследований популяций растений в зонах техногенных загрязнений. Полученные данные вносят вклад в создание научной основы для разработки отечественных и международных нормативных документов в области экологической безопасности, а также рекомендаций о возможности практического использования загрязненных территорий. Полученные результаты использованы в лекционном курсе «Радиоэкология с основами радиобиологии», который входит в программу подготовки магистров в ФГАОУ ВПО Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина.

Методология и методы исследования. Исследование построено на классической методологии работ в природных загрязненных экосистемах, основанной на сочетанном решении трех задач: 1) оценка источников и уровней загрязнения территории; 2) расчет техногенных нагрузок в локальных местообитаниях; 3) изучение действия поллютантов на растительные организмы (Тимофеев-Ресовский, 1962; Позолотина, 2003; Воробейчик, Козлов, 2012). Сбор почв, семян и листьев *P. major* проводили в зонах загрязнения радионуклидами (ВУРС) и тяжелыми металлами (зона влияния Карабашского медеплавильного завода), а также на фоновых территориях. Участки в зонах располагались на разном удалении от источников загрязнения с учетом градиента. Оценку качества семенного потомства проводили путем проращивания семян методом рулонной культуры. Радиоустойчивость определяли, предварительно облучая семена на γ -установке ^{137}Cs типа «ИГУР», а металлоустойчивость оценивали, выращивая проростки на суспензии, содержащей почву с загрязненных участков зоны Карабашского медеплавильного завода. Проксидантный статус проростков анализировали по содержанию продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида. Антиоксидантный статус проростков оценивали по активности ферментов антиоксидантной защиты (каталаза, пероксидаза и супероксиддисмутаза) и содержанию низкомолекулярных антиоксидантов.

Генетическую изменчивость в ценопопуляциях *P. major* изучали с использованием 9 микросателлитных локусов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Семенное потомство *P. major* из зон радиоактивного и химического загрязнения, а также с фоновых территорий характеризуется высокой меж- и внутривопуляционной изменчивостью. На участках с наибольшими уровнями техногенной нагрузки наблюдалось снижение ростовых показателей у проростков. Стабильных различий по радио- и металлоустойчивости у семенного потомства из зон техногенного загрязнения и фоновых участков не выявлено, т.е. эффект преадаптации отсутствует.

2. Про- и антиоксидантные статусы семенного потомства *P. major* из зон радиоактивного и химического загрязнения отличны от фоновых выборок и различаются между собой. В зоне радиоактивного загрязнения у проростков зафиксирован прооксидантный сдвиг по сравнению с растениями из зоны химического загрязнения и фоновыми. Данные свидетельствуют о том, что специфика адаптивных ответов растений формируется за счет различий в индукции активных форм кислорода при действии радиации и тяжелых металлов.

3. Генетическое разнообразие в ценопопуляциях *P. major* из зон радиоактивного и химического загрязнения снижено по сравнению с фоновыми выборками. Этот феномен обусловлен различными причинами. В зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа вероятной причиной является снижение миграции генов, связанное с ограничением доступа человека на загрязненную территорию. В ближней зоне влияния Карабашского медеплавильного завода снижение генетического разнообразия связано с неблагоприятными условиями для закрепления вида, обусловленными сильным антропогенным воздействием.

Степень достоверности и апробация результатов. Обоснованность выводов и защищаемых положений, представленных в диссертационной работе, обеспечена применением современных методов, адекватных поставленным задачам. Проанализирован большой объем данных, полученных автором в ходе экспедиционных работ и экспериментальных исследований. Результаты проанализированы с применением современных статистических методов.

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на: Sixth, Seventh International conferences on radiation and applications in various fields of research (Ohrid, 2018; Herceg Novi, Montenegro, 2019); V Всероссийской научно-практической конференции «Биологические системы: устойчивость, принципы и

механизмы функционирования» (Нижний Тагил, 2017); Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: факты, гипотезы, модели», посвященной памяти Н.В. Глотова (Екатеринбург, 2018); VII Международной научной конференции «Принципы и способы сохранения биоразнообразия» (Йошкар-Ола, 2019); Международной молодежной конференции «Современные проблемы радиобиологии, радиоэкологии и агроэкологии» (Обнинск, 2019). Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, а также при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-01023).

Личный вклад автора. Шималина Надежда Сергеевна лично участвовала в экспедиционных работах по сбору полевого материала, в планировании и проведении лабораторных исследований. Математический анализ данных, интерпретация и обобщение результатов выполнены автором лично или при ее непосредственном участии. Соискатель принимала участие в подготовке всех публикаций и представляла полученные результаты на конференциях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ и индексируемых WoS.

Структура и объем диссертационной работы. Работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 364 источника, из них 206 на иностранном языке, и приложения. Диссертация изложена на 139 страницах, основной текст включает 23 рисунка, 9 таблиц, в приложении помещена 1 таблица.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ У РАСТЕНИЙ В ЗОНАХ РАДИОАКТИВНОГО И ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Выполнен анализ отечественных и зарубежных исследований, посвященных проблемам загрязнения окружающей среды радионуклидами и тяжелыми металлами, а также действия этих факторов на биоту на разных уровнях ее организации. Особое внимание уделено влиянию ионизирующих излучений и тяжелых металлов на качество семенного потомства и рост растений, а также на индукцию окислительного стресса у растений в результате действия этих факторов. Рассмотрены также особенности влияния радиоактивного и химического

загрязнения на изменчивость генетической структуры природных популяций растений.

Глава 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗОН РАДИОАКТИВНОГО И ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Исследованная территория расположена на восточном макросклоне Южного Урала и относится к подзонам лесостепи и сосново-березовых разнотравных лесов (Степанов и др., 1992; Смирнов, 1993). Эпицентр аварии на ПО «Маяк», в результате которого в 1957 г. сформировался Восточно-Уральский радиоактивный след (ВУРС), расположен на расстоянии около 50 км к северо-востоку от Карабашского медеплавильного завода (КМЗ). Географические координаты и характеристики техногенных нагрузок на участках представлены в табл. 1. Расстояния от источников техногенного загрязнения введены в маркировку участков.

Таблица 1 – Географические координаты и оценки техногенных нагрузок на растения *P. major* в зонах ВУРСа, КМЗ и на фоновых участках

Участок	Географические координаты	Техногенная нагрузка
Фон-1	55°42'45'' с.ш., 60°28'13'' в.д.	МПД* = 0.1086 ** $K_i = 1.0$
Фон-2	55°37'09'' с.ш., 60°27'04'' в.д.	
Фон-3	56°36'05'' с.ш., 61°03'25'' в.д.	
Фон-4	56°47'16'' с.ш., 61°17'58'' в.д.	
ВУРС-16	55°49'23'' с.ш., 60°55'41'' в.д.	МПД = 19.1
ВУРС-10	55°46'40'' с.ш., 60°52'42'' в.д.	МПД = 73.1
ВУРС-5	55°44'11'' с.ш., 60°50'01'' в.д.	МПД = 157.1
КМЗ-10	55°31'12'' с.ш., 60°19'43'' в.д.	$K_i = 5.2$
КМЗ-8	55°30'07'' с.ш., 60°18'15'' в.д.	$K_i = 13.8$
КМЗ-5	55°30'01'' с.ш., 60°15'27'' в.д.	$K_i = 13.0$
КМЗ-1	55°27'36'' с.ш., 60°11'15'' в.д.	$K_i = 41.8$

Примечание – *МПД – мощность поглощенной дозы, мкГр/ч, рассчитана для родительских растений *P. major* с учетом естественного радиационного фона, равного для Уральского региона ≈ 0.1 мкГр/ч; ** K_i – индекс суммарной токсической нагрузки.

Зона радиоактивного загрязнения. В настоящее время основным загрязнителем ВУРСа является β -излучатель ^{90}Sr , плотность загрязнения почв в пределах центральной оси достигает 70000 кБк/м² (фоновый уровень 1.5–3 кБк/м²) и уменьшается с расстоянием от эпицентра взрыва согласно экспоненциальной функции (Molchanova et al., 2014). Дополнительное загрязнение территории ^{137}Cs

произошло в 1967 г. в результате переноса ила и песка с берегов обмелевшего озера Карачай – открытого хранилища радиоактивных отходов (Aarkrog et al., 1997; Никипелов и др., 1990). В зоне ВУРСа были выбраны три участка вдоль центральной оси следа (см. табл. 1).

Зона химического загрязнения. КМЗ начал работу в 1910 г. при полном отсутствии оборудования по очистке пылегазовых выбросов и сточных вод. В 60-е и 70-е годы выбросы загрязняющих веществ в атмосферу были максимальны: сернистый ангидрид – до 365 тыс. т/год, пыль с сорбированными в ней тяжелыми металлами (ТМ) – до 31 тыс. т/год (Степанов и др., 1992). В 90-е годы была проведена реконструкция, после которой выбросы существенно снизились, в 1994 г. по ТМ они составили около 0.8 тыс. т/год (Черненкова, 2002). Однако запас поллютантов (Zn, Cu, Pb, Cd), накопленный в почвах, остается до сих пор очень большим, превышая фоновый уровень на 1–2 порядка величин (Сморкалов, Воробейчик, 2011). В зоне влияния КМЗ были выбраны четыре площадки в северо-восточном направлении от предприятия (см. табл. 1).

Четыре фоновые площадки находились вне зон техногенного загрязнения.

Глава 3. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования выбран подорожник большой (*Plantago major* L.) – многолетнее травянистое поликарпическое растение из семейства Plantaginaceae Juss. Вид диплоидный ($2n = 12$). *P. major* – анемофильное растение, его видовыми особенностями являются самосовместимость и высокий уровень самоопыления (Van Dijk, Van Delden, 1981). Выбор данного вида обусловлен его повсеместной встречаемостью в средних широтах, существованием в широком диапазоне экологических условий и высокой семенной продуктивностью.

Места отбора проб были приурочены к обочинам редко используемых проселочных дорог и просекам, на которых закладывали трансекты протяженностью от 0.5 до 1 км. На каждом реперном участке в августе 2015 г. собирали смесь семян с 40–50 растений. Для оценки индивидуальной изменчивости качества семенного потомства на каждом реперном участке дополнительно собирали семена с 10 индивидуальных растений (расстояние между растениями составляло 10–30 м). Для анализа изменчивости микросателлитных локусов (SSR) на каждом участке были отобраны листья с 25 растений (расстояние между растениями 10–30 м). В полевых условиях собранные листья замораживали в жидком азоте, в лаборатории образцы хранили при $t = -20$ °С.

Методы исследования. Для оценки качества семенного потомства *P. major*, а также его радио- и металлоустойчивости, провели серию экспериментов, проращивая семена методом рулонной культуры в течение 21 суток при +24 °С и 12-часовом фотопериоде (Шималина и др., 2017, 2018). Эксперименты проводили в 3–4 повторностях, высевая по 25 семян на повторность. Жизнеспособность семенного потомства оценивали по комплексу критериев (всхожесть семян, выживаемость проростков, длина корней, доля проростков с настоящими листьями). Для оценки радиочувствительности семена перед посевом облучали в дозах 100–400 Гр на γ -установке типа «ИГУР» с источником ^{137}Cs . Металлоустойчивость семенного потомства оценивали, проращивая семена на почвенной суспензии, содержащей почву с участков из зоны влияния КМЗ (взвесь в воде 1:10, в контрольных вариантах использовали почву с фоновых площадок). Проростки, выращенные без провокаций, использовали для оценки про- и антиоксидантного статуса семенного потомства.

Антиоксидантный статус проростков P. major оценивали по активности трех ферментов: супероксиддисмутазы (SOD, EC 1.15.1.1), каталазы (CAT, EC 1.11.1.6) и пероксидазы (POX, EC 1.11.1.7). Высушенные проростки гомогенизировали в буферном растворе (pH = 7.4), содержащем трис-HCl и KCl. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 16000 g и $t = +4$ °С. Активность SOD оценивали по ингибированию образования на свету окрашенного продукта восстановления нитросинего тетразолия при 560 нм с участием рибофлавина и L-метионина (Giannopolitis, Ries, 1977). Активность CAT измеряли при 410 нм по интенсивности желтого окрашивания, образующегося в реакции перекиси водорода с солями молибдена (Góth, 1991). Активность POX определяли при 610 нм по снижению интенсивности окраски раствора при окислении перекисью водорода индигокармина (Попов, Нейковска, 1971). Количество растворимого белка определяли в ходе качественной реакции с красителем Coomassie Brilliant Blue G250 (Kruger, 2002). Также определяли суммарное содержание низкомолекулярных антиоксидантов (НМАО) в проростках. Метод определения суммарного содержания НМАО основан на их окислении хлоридом железа (III) (Ермаков и др., 1987), измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре DU-650 (Beckman Coulter, USA) при длине волны 510 нм. Прооксидантный статус оценивали по концентрации вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), основным из которых является малоновый диальдегид (MDA). Содержание MDA определяли, используя реакционную среду, состоящую из раствора трихлоруксусной и тиобарбитуровой кислоты, оптическую плотность измеряли при

длине волны 532 нм (Buege, Aust, 1978). Измерение количества MDA, белка и активности ферментов осуществляли на микропланшетном спектрофотометре SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, USA).

Для проверки статистических гипотез использовали однофакторный дисперсионный анализ, непараметрические критерии Краскела-Уоллиса (H), Данна и Манна-Уитни (U) в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., 2011). Для установления корреляционных связей использовали коэффициент корреляции Спирмена.

Для анализа *генетической изменчивости* использовали 9 микросателлитных локусов, разработанных для *P. major* и близкородственного ему вида *P. intermedia* (Squirrell, Wolff, 2001; Wolff et al., 2009). Общую ДНК выделяли, используя СТАВ метод (Doyle, 1991). ПЦР проводили с использованием амплификатора Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) согласно протоколам (Squirrell, Wolff, 2001; Wolff et al., 2009). 5'-конец F-прайма модифицировали флуоресцентной меткой (FAM, ROX, TAMRA, R6G). Капиллярный электрофорез проведен на автоматическом генетическом анализаторе ABI3130 (Applied Biosystems) в присутствии размерного стандарта S-550 (Гордиз). Хроматограммы расшифрованы в программе GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). Расчеты генетических параметров, а также тест Мантеля, выполнены в программе GenAlex 6.501 (Peakall, Smouse, 2012). Дендрограмма генетической дифференциации построена на основе генетических дистанций Нея с использованием метода объединения ближайших соседей в программе POPTREE2 (Takezaki et al., 2009). Для анализа внутривидовой структуры выполнили кластеризацию выборки в программе Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003).

Глава 4. ТЕХНОГЕННЫЕ НАГРУЗКИ И КАЧЕСТВО СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА *P. MAJOR* ИЗ РАЗНЫХ ЗОН

Техногенные нагрузки. Дозовые нагрузки растений *P. major*, произрастающих в зоне ВУРСа (см. табл. 1), были рассчитаны в программе ERICA Tool на основе эмпирических данных по удельной активности основных дозообразующих радионуклидов ^{90}Sr , ^{137}Cs , а также $^{239,240}\text{Pu}$ в пробах почв и вегетативной массы (Karimullina et al., 2018). МПД для подорожника в зоне ВУРСа превышали фоновый уровень в 178–1455 раз. Суммарная поглощенная доза за вегетативный сезон (с апреля по октябрь) для растений из зоны ВУРСа варьировала от 69 до 564 мГр. Полученные значения относятся к диапазону малых доз.

Токсическая нагрузка растений на площадках зоны влияния КМЗ имеет комплексный характер (сернистый ангидрид, пыль, тяжелые металлы в почве). В нашей работе токсическая нагрузка оценена по содержанию подвижных форм тяжелых металлов (Cu, Cd, Pb, Zn) в почвах (горизонт А1, глубина 0–10 см) с помощью индекса суммарной токсической нагрузки. Согласно данным (см. табл. 1), уровни токсической нагрузки в зоне влияния КМЗ превышают фоновые значения в 5.2–41.8 раза.

Жизнеспособность семенного потомства *P. major*. В пределах каждой зоны отмечена высокая межпопуляционная изменчивость всхожести семян и выживаемости проростков *P. major* (рис. 1), эти два показателя были равны или незначительно отличались. Анализ выборок, объединенных в пределах зон, показал отсутствие значимого влияния фактора «зона» на выживаемость проростков ($H_{(2;44)} = 0.91$; $p = 0.633$), что объясняется высокой межпопуляционной изменчивостью выживаемости внутри каждой зоны.

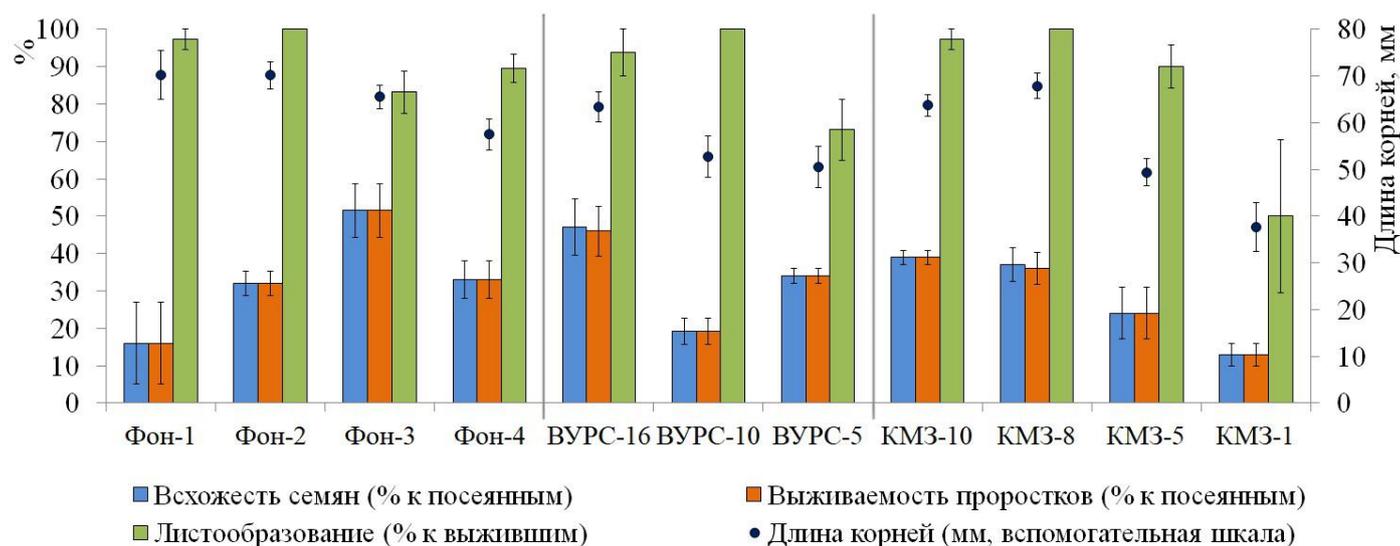


Рисунок 1 – Основные показатели жизнеспособности ($M \pm SE$) семенного потомства *P. major* из импактных и фоновых ценопопуляций

В выборках с наибольшими уровнями техногенной нагрузки как в случае радиоактивного, так и химического загрязнения, отмечена тенденция к угнетению листообразования. Однако при объединении выборок по зонам в соответствии с типом техногенного воздействия не обнаружено значимого влияния фактора «зона» на процесс формирования листьев ($H_{(2;43)} = 0.05$; $p = 0.977$).

В целом, у растений из зоны КМЗ был угнетен рост корней, показано значимое влияние фактора «зона» на их длину ($F_{(2;342)} = 5.43$; $p = 0.005$). Наименьшая длина корней отмечена в выборке, приуроченной к участку с наибольшим уровнем

химического загрязнения КМЗ-1 (значимые различия с выборками Фон-1, Фон-2, Фон-3, ВУРС-16, КМЗ-10, КМЗ-8, критерий Данна, $p = 0.001-0.044$).

При оценке внутривидовой изменчивости всхожести семян и выживаемости проростков (10 индивидуальных растений) во всех изученных ценопопуляциях выявлено значимое влияние фактора «индивидуальная составляющая» на выживаемость ($H_{(8-9;27-30)} = 19.42-26.78$; $p = 0.002-0.022$) и длину корней ($H_{(9; 296-666)} = 40.17-109.85$; $p \ll 0.001$). В большинстве ценопопуляций потомки разных родителей не различались по листообразованию: фактор «индивидуальная составляющая» не оказывал значимого влияния ($H_{(9;28-30)} = 9.09-16.5$; $p = 0.06-0.42$). В выборке ВУРС-5 доля проростков с настоящим листом была наименьшей (значимые различия с выборками Фон-1, КМЗ-10, КМЗ-8, КМЗ-1, критерий Данна, $p = 0.001-0.021$). При анализе индивидуальной изменчивости показателя «длина корня» самое низкое среднее значение (30.7 мм) отмечено в выборке КМЗ-1, как и при проращивании смеси семян. Характеристики жизнеспособности семян из импактных и фоновых выборок при разных способах оценки (смесь семян или 10 индивидуальных растений) оказались в целом сходными. В обоих случаях выборка ВУРС-5 характеризовалась низкой скоростью листообразования, а КМЗ-1 – наименьшей длиной корней (Шималина и др., 2017, 2018).

Радио- и металлоустойчивость семенного потомства *P. major*.

Провокационное предпосевное облучение семян *P. major* в дозах от 100 до 400 Гр в большинстве выборок из всех зон не приводило к значительному снижению всхожести семян. Наиболее чувствительными оказались ростовые характеристики, при этом все выборки из разных зон реагировали на облучение сходным образом. Длина корней после облучения сильно снизилась во всех выборках уже при 100 Гр, в большинстве выборок длина корня не превышала 5 мм (в контроле значения варьировали от 38 до 70 мм). Эффекта преадаптации к радиационному фактору у проростков из зон ВУРСа и КМЗ не выявлено. Наиболее чувствительным показателем к действию ТМ, как и в случае провокационного облучения, был рост корней, в то время как листообразование в большинстве выборок не отличалось от контроля. В целом, семенное потомство подорожника большого из зон ВУРСа и КМЗ не различалось по радио- и металлоустойчивости, большинство выборок реагировали на провокационное воздействие «привычного» и «нового» для них фактора сходным образом.

Глава 5. ОЦЕНКА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ПРОРОСТКОВ *P. MAJOR* ИЗ РАЗНЫХ ЗОН

В пределах каждой зоны между выборками не было выявлено значимых различий по всем показателям, характеризующим про- и антиоксидантный статус семенного потомства: содержание MDA ($H_{(2-3;15-25)} = 2.72-3.24$, $p = 0.198-0.436$); активность SOD ($H_{(2-3;15-25)} = 1.38-5.52$, $p = 0.137-0.501$); активность CAT ($H_{(2-3;15-25)} = 2.42-5.27$, $p = 0.071-0.297$); активность POX ($H_{(2-3;15-25)} = 2.42-5.67$, $p = 0.129-0.297$); содержание НМАО ($H_{(1-3;6-12)} = 2.33-4.85$, $p = 0.067-0.183$).

Выборки *P. major* из зоны ВУРСа значимо отличались от фоновых по активности ферментов: активность SOD была повышена (270 % от фоновых; U -тест, $p < 0.001$) и CAT (199 %; U -тест, $p = 0.040$), активность POX, напротив, была ниже, чем в фоновых (44 %; U -тест, $p = 0.011$) (Шималина и др., 2018). Выборки из зоны КМЗ также значимо отличались от фоновых по активности ферментов. Так, у проростков из зоны КМЗ обнаружена пониженная активность SOD (60 % от фоновых; U -тест, $p = 0.029$), CAT (33 % от фоновых; U -тест, $p < 0.001$) и более высокая активность POX (122 % от фоновых; U -тест, $p < 0.001$) (Шималина и др., 2017).

По содержанию MDA фоновые и импактные выборки КМЗ не различались (U -тест, $n = 15-25$, $p = 0.276$). Сравнение выборок ВУРСа и КМЗ выявило значимые различия по содержанию MDA (U -тест, $n = 21-25$, $p = 0.016$) и активностям SOD, CAT, POX (U -тест, $n = 21-25$, $p < 0.001$). Таким образом, у проростков из зоны ВУРСа отмечено повышение активностей SOD, CAT, содержания MDA и снижение активности POX как относительно выборок зоны КМЗ, так и фоновых.

Многомерное сравнение биохимических данных методом главных компонент (рис. 2) показало, что проекции точек, принадлежащие импактным и фоновым участкам, частично перекрывались по первой главной компоненте (ГК-1). На эту компоненту приходится 72.7 % межгрупповой дисперсии, которая базируется на корреляции с активностью SOD ($\beta = 0.98$), CAT ($\beta = 0.99$) и POX ($\beta = -0.98$). Ценопопуляции из зоны ВУРСа оказались более обособленными по ГК-2, где основной вклад в межгрупповую изменчивость вносило значение MDA ($\beta = 0.99$).

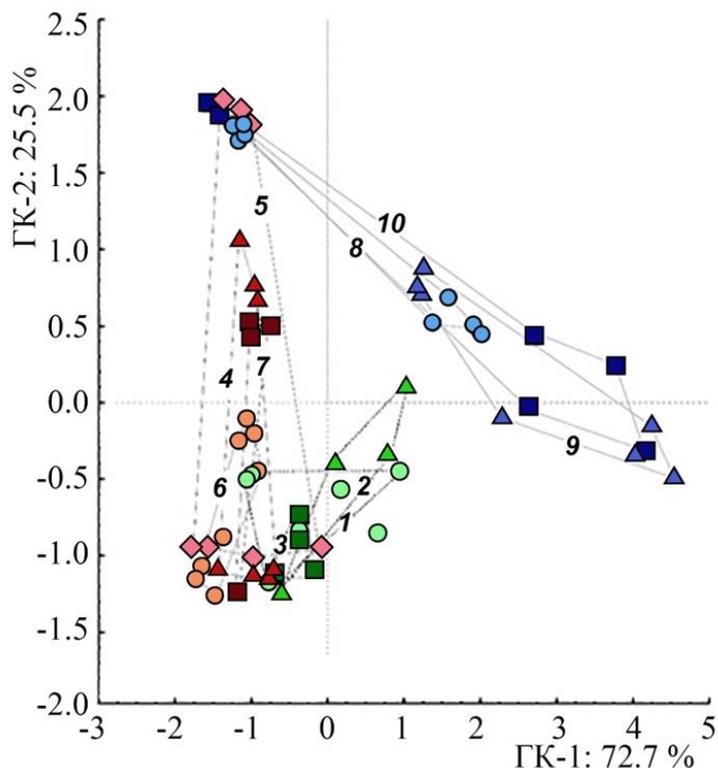


Рисунок 2 – Расположение фоновых и импактных выборок на плоскости двух главных компонент, образованных биохимическими характеристиками:

ГК-1 – ферменты антиоксидантной защиты; ГК-2 – MDA.

1 – Фон-2; 2 – Фон-4; 3 – Фон-4;

4 – КМЗ-10; 5 – КМЗ-8; 6 – КМЗ-5;

7 – КМЗ-1;

8 – ВУРС-16; 9 – ВУРС-10; 10 – ВУРС-5

Сравнение значений интегрального про-антиоксидантного индекса $PAI = MDA / (SOD + CAT + POX)$ позволяет зафиксировать наличие существенного прооксидантного сдвига в импактных выборках ВУРСа по отношению к фоновым (331%, U -тест, $n = 15-21$, $p < 0.001$) и выборкам КМЗ (510 %, U -тест, $p < 0.001$). Результаты указывают на то, что при установленном режиме ферментативной защиты, осуществляющей дезактивацию АФК, скорость накопления вторичных продуктов ПОЛ в импактных ценопопуляциях ВУРСа была в 3 и 5 раз выше, чем в выборках фона и КМЗ соответственно. В выборках ВУРСа отмечено увеличение суммарного содержания НМАО по сравнению с зоной КМЗ и фоновой ($H_{(2;27)} = 9.85$, $p = 0.007$; критерий Данна, $p = 0.013-0.038$).

Глава 6. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ЦЕНОПОПУЛЯЦИЯХ

P. MAJOR ИЗ РАЗНЫХ ЗОН

По результатам отбора в анализ включили 9 микросателлитных локусов: *Pm3*, *Pm9*, *JPm14*, *Jpi11*, *JPi4*, *JPi7*, *JPi16*, *JPi18*, *JPi21*. У *P. major* из изученных выборок в 9 локусах обнаружено 65 аллелей, число аллелей на локус варьировало от 1 до 25 (Shimalina et al., 2020). Локус *JPi21* оказался мономорфным во всех ценопопуляциях. Наблюдаемое соотношение генотипов в абсолютном большинстве случаев не соответствовало соотношению Харди-Вайнберга: наблюдаемая

гетерозиготность (H_o) была значимо меньше ожидаемой (H_E) (табл. 2). Уровень инбридинга особей в ценопопуляциях, оцененный по индексу фиксации Райта (F), варьировал от 0.44 до 0.77.

Таблица 2 – Показатели генетической изменчивости *P. major* по 9 микросателлитным локусам

Ценопопуляция	N_A	N_E	H_o	H_E	F	PA
Фон-1	5.44	3.09	0.16	0.45	0.66	7
Фон-2	4.67	2.84	0.23	0.5	0.56	3
Среднее±SE	5.06±0.39	2.97±0.13	0.20±0.04	0.48±0.03	0.61±0.05	4.00±1.00
КМЗ-8	4.11	2.88	0.2	0.50	0.59	2
КМЗ-5	4.33	2.87	0.21	0.51	0.59	2
КМЗ-1	3.78	2.33	0.1	0.45	0.77	0
Среднее±SE	4.07±0.2	2.69±0.18	0.17±0.04	0.49±0.02	0.65±0.06	1.33±0.67
ВУРС-16	4.00	2.54	0.23	0.52	0.55	1
ВУРС-10	4.11	2.59	0.28	0.50	0.44	0
ВУРС-5	4.11	2.71	0.22	0.48	0.54	2
Среднее±SE	4.07±0.04	2.61±0.05	0.24±0.02	0.50±0.01	0.51±0.04	1.00±0.58

Примечание – N_A – среднее число аллелей на локус, N_E – эффективное число аллелей на локус, H_o – средняя наблюдаемая, H_E – средняя ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации Райта, PA – число уникальных аллелей.

Показатели среднего и эффективного числа аллелей на локус в ценопопуляциях из зон химического и радиоактивного загрязнения были ниже значений, отмеченных в фоновых ценопопуляциях. Наибольшее число редких (11–21) и уникальных аллелей (3–7) было обнаружено в фоновых выборках. В зоне ВУРСа отмечено 8–10 редких аллелей, а в зоне КМЗ их число составило 8–11, из которых 1–2 были уникальными в импактных выборках. Исключением стали ценопопуляции ВУРС-10 и КМЗ-1, где не было выявлено уникальных аллелей по всем изученным локусам. Снижение генетического разнообразия наиболее выражено на самой загрязненной площадке КМЗ-1, которая расположена в г. Карабаше в непосредственной близости от медеплавильного завода. Таким образом, в ценопопуляциях *P. major* из обеих зон техногенного воздействия (ВУРС и КМЗ) обнаружено снижение генетического разнообразия. Одной из причин снижения этих параметров в зоне ВУРСа может быть низкая интенсивность миграции семян из-за строгого ограничения доступа людей в зону радиоактивного загрязнения, учитывая, что подорожнику свойственна антропохория. Это подтверждается результатами теста Мантеля на изоляцию расстоянием (рис. 3).

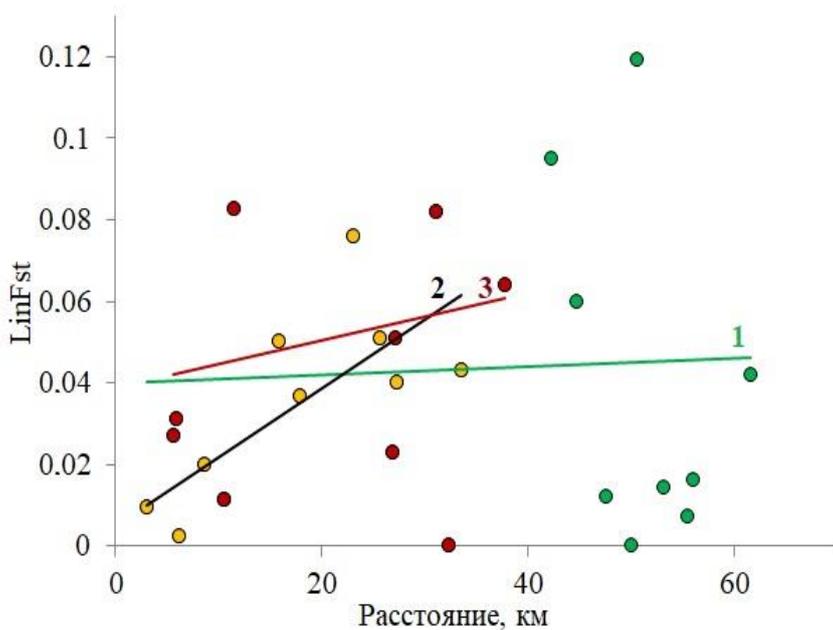


Рисунок 3 – Результаты теста Мантеля, характеризующие изоляцию расстоянием между ценопопуляциями *P. major* (p – уровни статистической значимости):

1 – все ценопопуляции, $R^2 = 0.003$, $p = 0.361$;

2 – фон и зона КМЗ, $R^2 = 0.546$; $p = 0.032$;

3 – фон и зона ВУРСа, $R^2 = 0.027$; $p = 0.313$

Для ценопопуляций из зоны КМЗ и фоновых площадок показана высокая статистически значимая связь между географическими и генетическими расстояниями. В случае зоны ВУРСа, а также при включении в анализ всех ценопопуляций, такой связи не прослеживается. Ценопопуляции КМЗ и фоновых участков расположены вблизи дорог общего пользования, что упрощает распространение семян подорожника человеком. Можно предполагать, что главной причиной снижения генетического разнообразия в зоне КМЗ является отбор особей, устойчивых к загрязнению среды обитания, поскольку не все мигранты способны выжить в условиях токсического и антропогенного стресса.

Анализ генетической дифференциации изученных ценопопуляций *P. major* (рис. 4) показал, что наиболее обособленными являются выборки ВУРСа. Поскольку ценопопуляции ВУРСа не образуют единого кластера, можно предполагать, что направленного отбора на повышенную радиостойчивость не прослеживается. Выборки из зоны КМЗ образуют единый кластер.

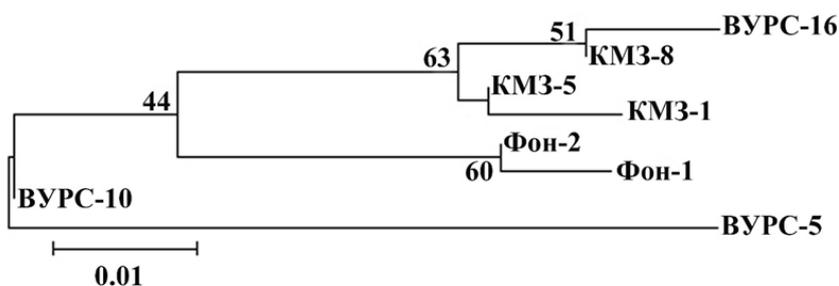
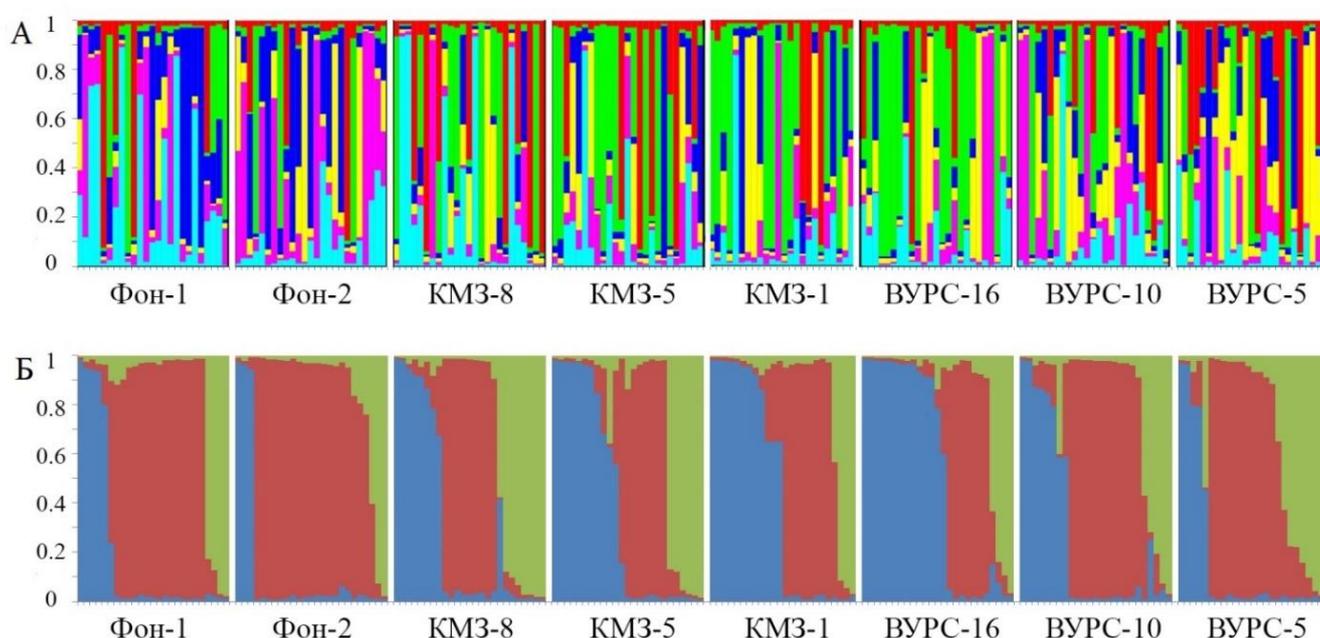


Рисунок 4 – Дендрограмма генетической дифференциации ценопопуляций *P. major*. Приведены значения бутстреп-поддержки узлов

Анализ внутривидовой структуры показал, что все ценопопуляции характеризовались высокой изменчивостью. При разделении всех проанализированных особей на 6 гипотетических генетических групп в каждой выборке присутствовали индивиды, принадлежащие к разным кластерам, независимо от типа загрязнения территории (рис. 5 А). Уникальных групп, представленных только в какой-либо одной зоне, не выявлено, хотя доля представленности разных кластеров различалась. При выделении 3 кластеров (рис. 5 Б) этот факт еще более очевиден, ни в одной из зон не было обнаружено уникальных групп, потомки всех родоначальников представлены в каждой ценопопуляции, только в разных долях.



А) $K = 6$, Б) $K = 3$

Рисунок 5 – Вероятность принадлежности индивидуального растения *P. major* к одной из возможных предковых групп

Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) показал, что только 4.1 % изменчивости распределено между популяциями, а 95.9 % сосредоточено внутри выборок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение экологических, биохимических и генетических характеристик семенного потомства *P. major* из зон радиоактивного и химического загрязнения представлено в табл. 3.

Таблица 3 – Сравнение биологических эффектов у *P. major* из зон радиоактивного и химического загрязнения

Показатель	Радиоактивное загрязнение (ВУРС)	Химическое загрязнение (КМЗ)
Качество семенного потомства	Отсутствие различий с фоновыми выборками по всхожести семян и выживаемости проростков. Угнетение листообразования в наиболее загрязненной выборке.	Отсутствие различий с фоновыми выборками по всхожести семян и выживаемости проростков. Угнетение роста корней в наиболее загрязненной выборке.
Радиоустойчивость	Отсутствие преадаптации.	Отсутствие преадаптации.
Металлоустойчивость	Отсутствие преадаптации.	Отсутствие преадаптации.
Содержание MDA	Повышено по сравнению с выборками КМЗ и фоновыми.	Снижено относительно выборок ВУРСа и не отличается от фоновых.
Активность SOD	Повышена по сравнению с выборками КМЗ и фоновыми.	Снижена по сравнению с выборками ВУРСа и фоновыми.
Активность CAT	Повышена по сравнению с выборками КМЗ и фоновыми.	Снижена по сравнению с выборками ВУРСа и фоновыми.
Активность POX	Снижена по сравнению с выборками КМЗ и фоновыми.	Повышена по сравнению с выборками ВУРСа и фоновыми.
Содержание НМАО	Повышено по сравнению с выборками КМЗ и фоновыми.	Снижено относительно выборок ВУРСа и не отличается от фоновых.
Прооксидантный статус, оцененный по интегральному индексу PAI	Выраженный прооксидантный сдвиг по сравнению с фоновыми выборками.	Отсутствие прооксидантного сдвига по сравнению с фоновыми выборками.
Генетическое разнообразие	Снижение генетического разнообразия относительно фоновых выборок вследствие уменьшения миграции генов.	Снижение генетического разнообразия относительно фоновых выборок вследствие трудности закрепления мигрантов на территории сильного антропогенного стресса.
Отбор устойчивых особей	Отсутствие выраженного влияния на нейтральную изменчивость.	Отбор устойчивых особей в наиболее загрязненных местообитаниях.
Связь между географическими и генетическими расстояниями	Связь отсутствует.	Значимая связь между географическими и генетическими расстояниями.

Качество семенного потомства, оцененное по всхожести семян и выживаемости проростков, не различалось между выборками всех изученных нами зон (фоновая, ВУРС, КМЗ). Только в наиболее загрязненных ценопопуляциях ВУРСа и зоны влияния КМЗ отмечено снижение ростовых показателей. Преадаптация семенного потомства подорожника к острому γ -облучению и токсическому влиянию ТМ не выявлена.

Показано, что специфическое действие разных по природе факторов четко проявилось у *P. major* на молекулярно-клеточном уровне. Выявлены разные адаптивные ответы про- и антиоксидантных систем у семенного потомства, сформировавшегося на территории ВУРСа и в зоне влияния КМЗ.

В ценопопуляциях *P. major* из обеих зон техногенного загрязнения отмечено снижение нейтральной генетической изменчивости. Мы предполагаем, что причиной этого феномена в зоне ВУРСа явилось снижение миграции семян в связи с ограничением доступа человека на загрязненную территорию, поскольку для *P. major* свойственна антропохория. В зоне влияния КМЗ снижение генетического разнообразия обусловлено отбором устойчивых к токсическому загрязнению организмов.

ВЫВОДЫ

1. Определенной связи всхожести семян и выживаемости проростков *P. major* с загрязнением почв радионуклидами и тяжелыми металлами не выявлено. Внутри каждой зоны отмечена высокая как меж-, так и внутривнутрипопуляционная изменчивость показателей жизнеспособности. Только в выборках из наиболее загрязненных участков ВУРСа и зоны влияния КМЗ обнаружено угнетение ростовых характеристик: в выборке ВУРС-5 у проростков снижены темпы роста листьев, в выборке КМЗ-1 отмечена наименьшая длина корней.

2. Семенное потомство *P. major* из зон ВУРСа и КМЗ не различалось по радио- и металлоустойчивости, большинство выборок реагировали на провокационное облучение и воздействие тяжелых металлов сходным образом. Эффект преадаптации у семенного потомства из зон радиоактивного и химического загрязнения не выявлен.

3. Установлены отличия антиоксидантного статуса семенного потомства *P. major*, сформировавшегося в зонах ВУРСа, КМЗ и на фоновых территориях. В зоне ВУРСа обнаружена повышенная по сравнению с фоном активность SOD, CAT и низкая активность POX, а в зоне КМЗ, напротив, отмечена пониженная активность SOD, CAT и высокая активность POX. Усиление антиоксидантной защиты за счет

НМАО показано только в ценопопуляциях ВУРСа.

4. В выборках ВУРСа выявлены повышенное содержание MDA и выраженный прооксидантный сдвиг по сравнению с ценопопуляциями КМЗ и фоновыми. В зоне КМЗ подобных эффектов относительно фоновых выборок не наблюдалось.

5. Анализ изменчивости микросателлитных локусов показал снижение генетического разнообразия в ценопопуляциях *P. major* из зон техногенного загрязнения. Вероятно, в зоне ВУРСа этот феномен обусловлен снижением миграции семян в связи с ограничением доступа человека на загрязненную территорию, а в зоне влияния КМЗ – с отбором генотипов, устойчивых к токсическому загрязнению.

6. Генетическое разнообразие в пределах каждой ценопопуляции *P. major* достаточно велико, несмотря на высокий уровень инбридинга. Уровень дифференциации между выборками составляет 4.1 %.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ и индексируемых WoS:

1. Позолотина В.Н. Адаптация *Plantago major* L. к длительному радиационному и химическому воздействию / В.Н. Позолотина, Е.В. Антонова, **Н.С. Шималина** // Экология. – 2016. – № 1. – С. 3-13.
2. **Шималина Н.С.** Оценка биологических эффектов у семенного потомства *Plantago major* L. в зоне воздействия медеплавильного производства / Н.С. Шималина, Н.А. Орехова, В.Н. Позолотина и др. // Экология. – 2017. – № 6. – С. 420-430.
3. **Шималина Н.С.** Особенности про- и антиоксидантных систем *Plantago major*, длительное время произрастающего в зоне радиоактивного загрязнения / Н.С. Шималина, Н.А. Орехова, В.Н. Позолотина // Экология. – 2018. – № 5. – С. 333-341.
4. **Shimalina N.S.** Genetic polymorphism of *Plantago major* populations from the radioactive and chemical polluted areas / N.S. Shimalina, E.V. Antonova, V.N. Pozolotina // Environmental pollution. – 2020. – V. 257. – P. 113607.

В сборниках статей и материалах конференций:

5. **Шималина Н.С.** Индивидуальная изменчивость жизнеспособности семенного потомства подорожника большого из зон радиоактивного и химического

загрязнения / Н.С. Шималина, Е.В. Антонова, В.Н. Позолотина // Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования» – Нижний Тагил: Изд-во НТГСПИ, 2017. – С. 359-364.

6. **Shimalina N.** Biochemical aspect of adaptation of *Plantago major* L. seed progeny from radioactive contaminated area / N. Shimalina, V. Pozolotina, N. Orekhova, E. Antonova // Book of abstracts sixth international conference on radiation and applications in various fields of research. – Ohrid, Macedonia, 2018. – P. 25.

7. **Шималина Н.С.** Изменчивость микросателлитных локусов у подорожника большого из зон радиоактивного и химического загрязнения // Экология: факты, гипотезы, модели. Материалы всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти Н.В. Глотова. ИЭРиЖ УрО РАН. – Екатеринбург: «Реэкшен», 2018. – С. 164-170.

8. **Шималина Н.С.** Сравнительная характеристика подорожника большого из зон радиоактивного и химического загрязнения / Н.С. Шималина, В.Н. Позолотина // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: материалы VII Международной науч. конф. – Йошкар-Ола: ООО Типография «Вертикаль», 2019. – С. 268-272.

9. **Shimalina N.** Genetic diversity in *Plantago major* L. populations growing under conditions of radioactive and chemical contamination / N. Shimalina, M. Modorov, E. Antonova, V. Pozolotina // Book of abstracts seventh international conference on radiation in various fields of research. – Herceg Novi, Montenegro, 2019. – P. 392.

10. **Шималина Н.С.** Адаптивный потенциал семенного потомства подорожника большого из зон радиоактивного и химического загрязнения / Н.С. Шималина // Современные проблемы радиобиологии, радиоэкологии и агроэкологии: сборник докладов международной молодежной конференции. – Обнинск: ФГБНУ ВНИИРАЭ, 2019. – С. 106-109.

Подписано в печать 08.09.2020 г. Формат 60×48/16. Объем 1 авт.л.

Тираж 100 экз. Заказ № _____

Отпечатано в типографии «Копирка»
620144, г. Екатеринбург, ул. Хохрякова, 98