

Институт экологии растений и животных УрО РАН

**ЭКОЛОГИЯ:
ФАКТЫ, ГИПОТЕЗЫ, МОДЕЛИ**

Материалы конференции молодых ученых,
посвященной 170-летию В.В. Докучаева
11–15 апреля 2016 г.



Екатеринбург

ЮЩИКИ

2016

УДК 574 (061.3)

Э 40

*Материалы конференции изданы при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-34-10069).*



Экология: факты, гипотезы, модели. Материалы конф. молодых ученых, 11–15 апреля 2016 г. / ИЭРиЖ УрО РАН – Екатеринбург: Гощицкий, 2016 – 160 с.

В сборнике опубликованы материалы Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 170-летию В.В. Докучаева «Экология: факты, гипотезы, модели». Мероприятие проходило в Институте экологии растений и животных УрО РАН с 11 по 15 апреля 2016 г. Работы посвящены проблемам изучения биологического разнообразия на популяционном, видовом и экосистемном уровнях, этологии, анализу экологических закономерностей эволюции, поиску механизмов адаптации биологических систем к экстремальным условиям, а также популяционным аспектам экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.

В оформлении обложки использована фотография победителя фотоконкурса конференции С.Г. Мещерягиной «Приморские саванны».

ISBN 978-5-98829-051-3

© Авторы, 2016

© ИЭРиЖ УрО РАН, 2016

© Оформление. Издательство «Гощицкий», 2016

Особенности F-1 поколения подорожника большого из зон радиоактивного и химического загрязнения

Н.С. Шималина

Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург

Ключевые слова: *Plantago major* L., ионизирующее излучение, тяжелые металлы, радиустойчивость, металлоустойчивость.

ВВЕДЕНИЕ

Влияние ионизирующего излучения и тяжелых металлов на растения показано во многих работах (Барсукова, 1997; Безель, 2006; Batool et al., 2015). Однако большая часть исследований проводилась в лабораторных условиях и в течение короткого периода времени (Москалев, Шапошников, 2009; Fuma et al., 2003). Особый интерес представляет изучение отдаленных последствий длительного действия техногенных факторов разной природы (низкоинтенсивное ионизирующее облучение и тяжелые металлы) на потомков растений после снятия стресса. Цель настоящей работы — исследование проявления родительского эффекта в выборках F-1 поколения подорожника большого из зон радиоактивного (Восточно-Уральский радиоактивный след, ВУРС) и химического (зона влияния Нижнетагильского металлургического комбината, НТМК) загрязнения после снятия техногенного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — подорожник большой (*Plantago major* L.) — многолетнее травянистое поликарпическое растение из семейства Plantaginaceae Juss. Размножается преимущественно семенами (Онтогенетический..., 1997). Вид диплоидный, $2n=12$ (Хромосомные..., 1969). Выбор данного вида обусловлен его повсеместной встречаемостью, существованием в широком диапазоне экологических условий, высокой семенной продуктивностью (Позолотина и др., 2008).

Семена родительского (Р) поколения подорожника большого были собраны в двух зонах: 1) радиоактивного загрязнения (ВУРС), 2) в зоне химического загрязнения (НТМК). Фоновые участки находились за пределами какого-либо загрязнения (Pozolotina et al., 2016). Подробная характеристика участков исследования, уровни радиационной и токсической нагрузки, а также характеристика Р-поколения приведены в предыдущих работах (Шималина, Антонова, 2014;

Шималина, 2015; Pozolotina et al., 2016). Дозовые нагрузки на площадках ВУРСа превышали фоновый уровень в 37–57 раз. Индексы токсической нагрузки на площадках НТМК были выше фонового уровня в 3–19 раз.

Семена Р-поколения собирали с 10 растений в двух ценопопуляциях из каждой зоны (всего 6 участков). Эти семена проращивали и культивировали в условиях выровненного агрофона (Биофизическая станция ИЭРиЖ УрО РАН, г. Заречный) до созревания F-1 поколения.

На следующий год семена F-1 поколения с 10 индивидуальных растений из каждой выборки проращивали в ходе лабораторного эксперимента методом рулонной культуры на суспензии, содержащей почву и дистиллированную воду (1:10), в течение трех недель. Эксперимент проводили в трех повторностях. В каждый сосуд высевали по 25 семян. Общее число исследованных семян – 13 486 шт. Жизнеспособность семян оценивали по комплексу критериев: всхожесть семян, выживаемость проростков, доля проростков с настоящими листьями, длина корня. Устойчивость к дополнительным воздействиям определяли по тем же параметрам, предварительно облучая семена в дозе 300 Гр (γ -установка «ИГУР»), либо проращивая семена на суспензии, содержащей почву с максимально загрязненного участка НТМК-2. Также учитывали частоту встречаемости аномалий в развитии проростков.

Для проверки статистических гипотез использовали критерий множественных сравнений Шеффе, непараметрический критерий Краскела-Уоллиса (H) и метод для анализа пропорций (Wilson, 1927; Newcombe, 1998) для независимых выборок. В последнем случае проверяли следующую нулевую гипотезу $H_0: P_1 - P_2 = 0$, где P_1 и P_2 – сравниваемые пропорции двух выборок. Если нижние и верхние границы 95%-ных доверительных интервалов (CI) для разностей сравниваемых пропорций не охватывали нулевое значение, то различия между выборками считали статистически значимыми (нулевую гипотезу H_0 отвергали на уровне значимости $p=0.05$). Анализ данных проводили в программе STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и с помощью макросов, созданных в MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность семенного потомства подорожника F-1 поколения

Всхожесть семян и выживаемость проростков во всех выборках были идентичны, либо значимо не различались, поэтому далее представлен анализ по показателю «выживаемость проростков» (рис. 1). Токсическая нагрузка на материнские растения влияла на выживаемость F-1 поколения, то есть влияние фактора «участок» было значимо ($H_{(5;180)} = 25.15; p = 0.0001$).

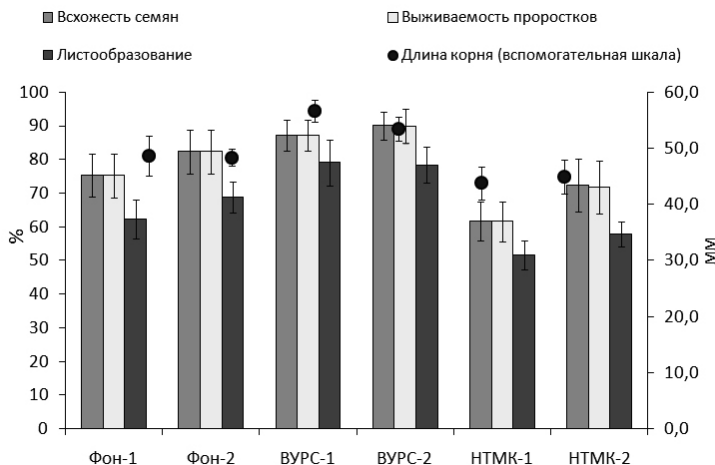


Рис. 1. Основные показатели жизнеспособности F-1 поколения *P. major*.

Так, выборка НТМК-1 значительно отличалась от Фон-2 и растений из зоны ВУРСа (критерий множественных сравнений Шеффе, $p < 0.05$). Как показано на рис. 2, наиболее широкий диапазон внутрипопуляционной изменчивости выживаемости проростков отмечен в выборках из зоны химического загрязнения ($CV=10.2-12.3\%$), а самый узкий — в выборках из зоны ВУРСа ($CV=6.2-6.4\%$). Влияние фактора «генотип», характеризующего уровень внутрипопуляционной изменчивости, было значимо ($H_{(9,30)} = 17.29-26.99$; $p=0.001-0.044$).

Наибольшее количество проростков с настоящими листьями отмечено в выборках из зоны радиоактивного загрязнения, а наименьшее — из зоны химического загрязнения (см. рис. 1; $p < 0.05$). По результатам однофакторного дисперсионного анализа влияние факторов «участок» ($H_{(5,180)} = 30.99$; $p=0.00001$) и «генотип» ($H_{(9,30)} = 19.10-26.79$; $p=0.0015-0.0244$) было значимо. По длине корня выборки НТМК-1 и НТМК-2 значительно отличались от выборки ВУРС-1 ($p < 0.05$). Анализ показал, что фактор «участок» значимо влиял на длину корня во всех выборках ($H_{(5,180)} = 26.93$; $p=0.00006$). Влияние фактора «генотип» было значимо только для выборок Фон-1, НТМК-1 и НТМК-2 ($H_{(9,30)} = 17.34-25.45$; $p=0.014-0.044$).

Таким образом, по комплексу показателей жизнеспособности F-1 поколение растений подорожника из выборок зоны НТМК было слабее по сравнению с остальными, а выборки из зоны ВУРСа и фоновых территорий выравнивались (различия между ними нивелировались). Ранее нами было показано, что у P-поколения показатели жизнеспособности проростков из разных зон изменялись в широких

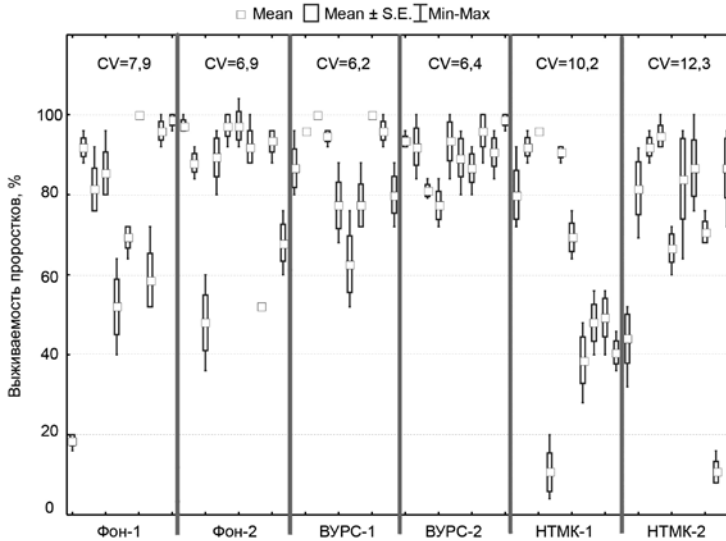


Рис. 2. Внутрипопуляционная изменчивость выживаемости проростков F-1 поколения *P. major* из разных зон. Точки внутри каждой зоны — индивидуальные растения.

пределах. Некоторые выборки из разных зон были ближе между собой, чем внутри зоны, при этом обе выборки из зоны НТМК отличались низкой жизнеспособностью по сравнению с другими выборками, самой жизнеспособной была выборка ВУРС-2 (Pozolotina et al., 2016).

Радиустойчивость F-1 поколения подорожника

У F-1 поколения подорожника выживаемость проростков после облучения значимо не изменилась по отношению к собственному необлученному контролю ($H_{(1;60)}=0.05-1.46$; $p=0.22-0.81$). Доля проростков с настоящими листьями после облучения также не изменилась во всех выборках ($H_{(1;60)}=0.01-3.66$; $p=0.06-0.93$) за исключением Фон-1 ($H_{(1;60)}=4.05$; $p=0.044$). Во всех выборках после облучения (рис. 3) отмечено значимое снижение длины корня у проростков ($p < 0.001$).

Влияние фактора «генотип» при провокации облучением было значимо ($H_{(9;30)}=17.15-26.79$; $p=0.002-0.046$), исключение составили выборки НТМК-2 по признаку «длина корня» ($H_{(9;30)}=16.76$; $p=0.053$) и ВУРС-2 по показателю «выживаемость проростков» ($H_{(9;30)}=14.95$; $p=0.09$).

Напомним, что у P-поколения в выборках из зоны ВУРСа и фоновых после облучения отмечено полное подавление формирования

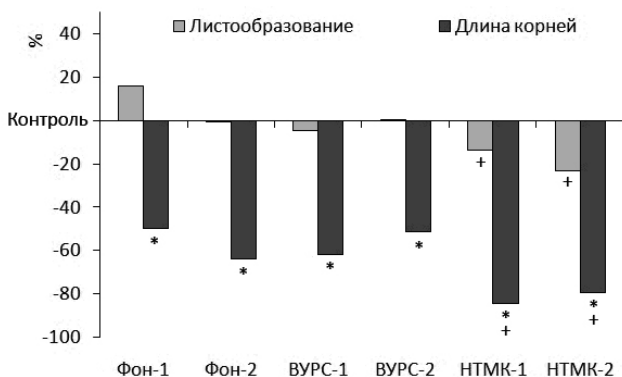


Рис. 3. Радиоустойчивость F-1 поколения подорожника из разных зон: * — значимые различия с собственным необлученным контролем; (+) — значимые различия с выборками Фон-1, Фон-2, ВУРС-1 и ВУРС-2 (критерий множественных сравнений Шеффе, $p < 0.05$).

настоящих листьев. При этом в выборках из зоны НТМК снижение скорости листообразования было наименьшим по сравнению с остальными выборками. Таким образом, по ростовым характеристикам отмечена сходная реакция родительского и F-1 поколения на дополнительное облучение.

Металлоустойчивость F-1 поколения подорожника

У подорожника F-1 поколения при провокации тяжелыми металлами реакция оказалась однотипной во всех выборках: отмечено значимое снижение длины корней у проростков (рис. 4). Число проростков с настоящими листьями в выборках ВУРСа и у фоновых растений снизилось незначительно, при этом выборки из зоны НТМК были самыми чувствительными.

Отметим, что в случае P-поколения при провокации ТМ наблюдалось разнообразие реакций, при этом выборки из зоны НТМК были устойчивыми, в то время как для выборок из зоны ВУРСа и фоновых растений была характерна чувствительность к дополнительному воздействию тяжелыми металлами (Pozolotina et al., 2016).

Частота морфологических аномалий у F-1 поколения подорожника

Во всех выборках подорожника P-поколения проростки с некрозами корней встречались редко — не более 2.5% от числа выживших. После облучения во всех выборках отмечено увеличение частоты встречаемости данной аномалии, при этом наименьшее число проростков с некрозами корней обнаружено в выборках из зоны НТМК

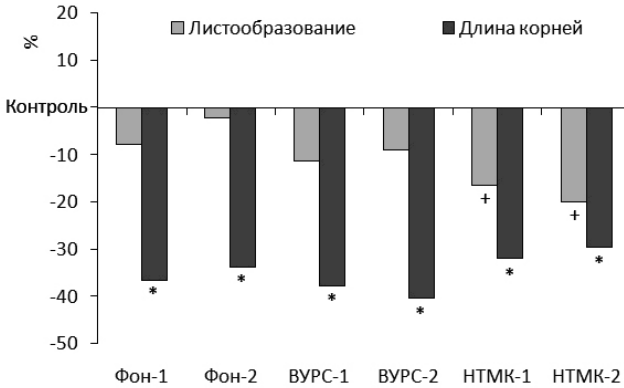


Рис. 4. Металлоустойчивость F-1 поколения подорожника из разных зон: * — значимые различия с собственным необлученным контролем; (+) — значимые различия с выборками Фон-2, ВУРС-1 и ВУРС-2 (критерий множественных сравнений Шеффе, $p < 0.05$).

(Pozolotina et al., 2016). У F-1 поколения без провокации частота встречаемости проростков с некрозами корня составила 2.2–9.9%. После облучения наибольшее число проростков с некрозами корней, в отличие от P-поколения, отмечено в выборках из зоны химического загрязнения (рис. 5). В случае провокации тяжелыми металлами частота встречаемости некрозов корней за редким исключением не возрастала.

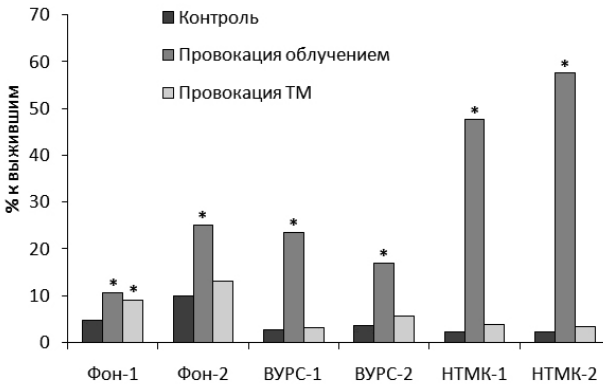


Рис. 5. Частота встречаемости проростков подорожника F-1 поколения с некрозом корня из разных выборок: * — значимые различия с собственным контролем, сравнение 95% доверительных интервалов CI (Newcombe, 1998).

Механизмы формирования морфозов различны: мутации генов, соматические мутации, апоптоз и т.д. (Моргун, Якимчук, 2011; Игонина и др., 2012). Так, на примере арабидопсиса было показано, что некрозы корней являются результатом рецессивной мутации, вызванной инсерцией Т-вектора рLD3 в область 32 экзона гена *YUP8H12R.44* (Tomilov et al., 2001).

В выборках F-1 поколения из зон техногенного загрязнения проростки с изменением формы листьев встречались чаще, чем в фоновых ценопопуляциях. Провокация тяжелыми металлами не вызвала значимого увеличения частоты аномалии. Однако в ответ на острое облучение в выборке ВУРС-2 отмечено значимое увеличение числа проростков с измененной формой листа.

Таким образом, аномалии в развитии проростков подорожника большого встречались чаще в выборках из зон техногенного загрязнения; реакция на провокационное облучение родительского и F-1 поколения была сходной, за исключением выборок из зоны НТМК по показателю «некроз корня».

Стрессовые факторы окружающей среды способны оказывать влияние не только на организмы, развивающиеся в данных условиях, но и на их потомков после снятия стресса. В частности, наследование может быть обусловлено материнским эффектом (Donohue, Schmitt, 1998). Формирование трансгенерационных эффектов может быть обусловлено различными механизмами: накопление разного количества питательных веществ в семенах (Donohue, Schmitt, 1998),

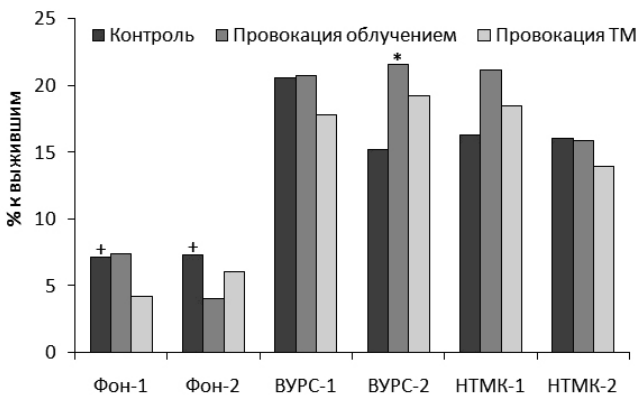


Рис. 6. Частота встречаемости проростков подорожника F-1 поколения с измененной формой настоящего листа: * — значимые различия с собственным необлученным контролем, (+) — значимые различия с остальными выборками ВУРСа и НТМК, сравнение 95% доверительных интервалов CI (Newcombe, 1998).

гормональная регуляция (Jha et al., 2010), эпигенетические модификации, такие как метилирование ДНК, которые могут сохраняться в нескольких поколениях (Herman, Sultan, 2011; Vanyushin, Ashapkin, 2011; Bilichak, Kovalchuk, 2016). Облучение родителей формирует эффекты генетической нестабильности в соматических и половых клетках потомков, передаваемые посредством нерепарированных разрывов ДНК, свободных радикалов, мутационных или эпигенетических изменений активности генов, отвечающих за поддержание стабильности генома (Москалев, Шапошников, 2009).

В исследовании, проведенном на подорожнике большим, было показано, что факторы окружающей среды, действующие на материнское растение, могут влиять на фенотипические характеристики потомства как минимум в трех поколениях (Miao et al., 1991). При экспериментальном изучении в череде поколений одуванчика лекарственного было показано, что индуцированные однократным острым γ -излучением изменения могут проявляться вплоть до пятого поколения, при этом ключевым моментом является нестабильность проявления эффектов (Позолотина, 2003). У одуванчика из природных популяций, испытывающих хроническое действие радиации и тяжелых металлов, также был выявлен трансгенерационный эффект: F-1 поколение этого вида из зоны ВУРСа обладало высокой жизнеспособностью, но при этом было чувствительно к дополнительной провокации облучением и тяжелыми металлами (Pozolotina et al., 2012). F1-поколение растений из зоны НТМК характеризовалось высокой жизнеспособностью и повышенной устойчивостью к этим факторам.

При сравнении экологических эффектов действия ионизирующего излучения и тяжелых металлов на модельных экосистемах (искусственно созданный микрокосм гидробионтов), установлено, что при действии γ -облучения дозы, вызывающие первые регистрируемые эффекты отличаются от доз, приводящих к полной деструкции системы в 15–20 раз, в то время как при действии тяжелых металлов для подобного изменения системы достаточно увеличения нагрузки в 2–10 раз (Fuma et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, после снятия техногенного стресса у F-1 поколения подорожника показатели жизнеспособности в выборках из зоны радиоактивного загрязнения и фоновых участков выровнялись. В то же время Р-поколение выборки ВУРС-2 обладало лучшими характеристиками. У F-1 поколения из зоны химического загрязнения показатели жизнеспособности были ниже, чем в остальных зонах, как и у Р-поколения.

При изучении радио- и металлоустойчивости реакция подорожника F-1 поколения из зоны химического загрязнения на «привычный» и на «новый» фактор изменилась: в родительском поколении эти выборки были устойчивы, а в F-1 поколении — наиболее чувствительны к провокационному воздействию. Выборки из зоны радиоактивного загрязнения и фоновые не различались по радио- и металлоустойчивости.

Автор выражает благодарность В.Н. Позолотиной и Е.В. Антоновой за помощь на всех этапах выполнения работы, а также Т.Е. Беляевой за участие в подготовке и проведении экспериментов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15–04–01023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барсукова В.С.* Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам. Новосибирск: ГПНТБ СО РАН, 1997. Вып. № 47. 63 с.
- Безель В.С.* Экологическая токсикология: популяционный и биоценологические аспекты. Екатеринбург: Гощицкий, 2006. 280 с.
- Игошина Е.В., Федотов И.С., Короткевич А.Ю., Рубанович А.В.* Морфологические аномалии у потомков облученных сосен (*Pinus sylvestris* L.) из чернобыльских популяций // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52, № 1. С. 90–102.
- Моргун В., Якимчук Р.* Мутагенная активность радионуклидных загрязнений в зоне аварии на Чернобыльской АЭС // Физиология и биохимия культурных растений. 2011. Т. 43, № 4. С. 279–286.
- Москалев А.А., Шапошников М.В.* Генетические механизмы воздействия ионизирующих излучений в малых дозах. СПб.: Наука, 2009. 137 с.
- Онтогенетический атлас лекарственных растений. Йошкар-Ола: Марийский госуниверситет, 1997. С. 121–132.
- Позолотина В.Н., Молчанова И.В., Караваева Е.Н.* и др. Современное состояние наземных экосистем зоны Восточно-Уральского радиоактивного следа: уровни загрязнения, биологические эффекты. Екатеринбург: Гощицкий, 2008. 204 с.
- Позолотина В.Н.* Отдаленные последствия действия радиации в чреде поколений у растений-апомиктов // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43, № 4. С. 462–470.
- Хромосомные числа цветковых растений: справочник. Л.: Наука, 1969. 926 с.
- Шималина Н.С., Антонова Е.В.* Качество семенного потомства *Plantago major* L. из зон радиоактивного и химического загрязнения // Мат. Всерос. конф. молодых ученых «Экология: популяция, вид, среда». Екатеринбург: Гощицкий, 2014. С. 167–171.
- Шималина Н.С.* Характеристика подорожника большого из зон радиоактивного и химического загрязнения: результаты вегетационного эксперимента // Мат. Всерос. конф. молодых ученых, посвященной 115-летию Н.В. Тимофеева-Ресовского «Экология, генетика, эволюция». Екатеринбург: Гощицкий, 2015. С. 152–156.

- Herman J.J., Sultan S.E.* Adaptive transgenerational plasticity in plants: case studies, mechanisms, and implications for natural populations // *Frontiers in Plant Science*. 2011. V. 2. № 102. eCollection 2011; doi: 10.3389/fpls.2011.00102
- Batool R., Hameed M., Ashraf M.* et al. Physio-anatomical responses of plants to heavy metals / *Phytoremediation for green energy*. Eds M. Öztürk, M. Ashraf, A. Aksoy et al. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. P. 79–96.
- Bilichak A., Kovalchuk I.* Transgenerational response to stress in plants and its application for breeding // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. № 7. P. 2081–2092.
- Donohue K., Schmitt J.* Maternal environmental effects in plants: adaptive plasticity / *Maternal effects as adaptations*. Eds T.A. Mousseau, C.W. Fox. Oxford University Press, 1998. P. 137–158.
- Fuma S., Ishii N., Takeda H.* et al. Ecological effects of various toxic agents on the aquatic microcosm in comparison with acute ionizing radiation // *J. Environ. Radioact.* 2003. V. 67. № 1. P. 1–14.
- Jha P., Norsworthy J.K., Riley M.B., Jr W.B.* Shade and plant location effects on germination and hormone content of palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) seed // *Weed Science*. 2010. V. 58. № 1. P. 16–21.
- Miao S.L., Bazzaz F.A., Primack R.B.* Persistence of maternal nutrient effects in *Plantago major*: the third generation // *Ecology*. 1991. V. 72. № 5. P. 1634–1642.
- Newcombe R.G.* Interval estimation for the difference between independent proportions: comparison of eleven methods // *Statistics in medicine*. 1998. V. 17. № 8. P. 873–890.
- Pozolotina V., Antonova E., Shimalina N.* Adaptation of greater plantain, *Plantago major* L., to long-term radiation and chemical exposure // *Russ J Ecol.* 2016. V. 47. № 1. P. 1–10.
- Pozolotina V.N., Antonova E.V., Bezel V.S.* Comparison of remote consequences in *Taraxacum officinale* seed progeny collected in radioactively or chemically contaminated areas // *Ecotoxicology*. 2012. V. 21. № 7. P. 1979–1988.
- Tomilov A.A., Tomilova N.B., Ogarkova O.A., Tarasov V.A.* Identification of a gene involved in the control of the root system development in *Arabidopsis thaliana* // *Russ J. Gen.* 2001. V. 37. № 1. P. 30–38.
- Vanyushin B.F., Ashapkin V.V.* DNA methylation in higher plants: past, present and future // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. 2011. V. 1809. № 8. P. 360–368.
- Wilson E.B.* Probable inference, the law of succession, and statistical inference // *J. Am. Stat. Assoc.* 1927. V. 22. № 158. P. 209–212.