

На правах рукописи

Дуля Олеся Викторовна

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ
ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ К ПРОМЫШЛЕННОМУ
ЗАГРЯЗНЕНИЮ

03.02.08 – экология

03.02.01 – ботаника

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2015

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

Научный руководитель **Воробейчик Евгений Леонидович**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Петрова Ирина Владимировна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад УрО РАН, заместитель директора по научной работе

Кутлунина Наталья Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Институт естественных наук, Департамент «Биологический факультет», доцент кафедры ботаники

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Марийский государственный университет»

Защита состоится «20» апреля 2015 г. в 13-00 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 « 10 » февраля 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Золотарева Наталья Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Содержание тяжелых металлов в почве вблизи крупных металлургических предприятий часто превышает токсичные для большинства живых организмов уровни. Поэтому растительные сообщества сильно загрязненных территорий представлены ограниченным набором видов со специфической репродуктивной, пространственной и генетической структурой популяций (Wu *et al.*, 1975; Ducouso *et al.* 1990; Bush, Barrett 1993; Genetic diversity ..., 2001; Дуля, 2010). Такая специфичность давно привлекает внимание исследователей.

На примере популяций импактных регионов продемонстрировано, что адаптация к стрессовым условиям может происходить в течение достаточно коротких промежутков времени. Этот феномен активно исследуют в рамках анализа металлоустойчивости и генетического разнообразия популяций. Ключевой метод первого направления – предложенный в середине 20 в. и используемый до сих пор – корневой тест (Wilkins, 1957), с помощью которого получены оценки металлоустойчивости многих видов. Постоянный рост количества публикаций, обуславливает периодическое появление обзорных работ по экологии и эволюции растений импактных регионов (напр.: Antonovics *et al* 1971; Baker, 1987; Ernst, 2006). Однако развитие современных методов математического анализа данных позволяет выполнить обобщения на качественно ином уровне – с помощью более формализованного и объективного способа свертывания информации по сравнению с традиционными обзорами литературы, т.е. с использованием методологии мета-анализа, преимущества которого – воспроизводимость и возможность верификации как первичных данных, так и выводов, сделанных на их основе (Littell *et al.*, 2008; Дуля, Микрюков, 2011; Козлов, Воробейчик, 2012).

Несмотря на обилие популяционно-генетических исследований, посвященных популяциям загрязненных территорий, механизмы регуляции их генетического разнообразия до сих пор остаются нераскрытыми. К видам, населяющим промышленно загрязненные территории, относится основной объект нашей работы – *Lychnis flos-cuculi* L., который можно считать одним из классических модельных объектов экологической генетики (Jensen, Meyer, 2001; Galeuchet *et al.*, 2005ab; Habitat fragmentation ..., 2008; Aavik *et al.*, 2012; Aavik *et al.*, 2014 и др.). Вместе с тем пока нет работ, посвященных металлоустойчивости этого вида, механизмам формирования пространственной структуры ценопопуляций и популяционно-генетическим процессам в сильных средовых градиентах, сопоставимых с градиен-

том загрязнения выбросами от крупного точечного источника эмиссии поллютантов. Таким образом, анализ популяций *L. flos-cuculi* из окрестностей медеплавильного завода предоставляет уникальную возможность заполнить пробелы в области экологической генетики, и особенно экологической токсикологии.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационного исследования – анализ эколого-генетических закономерностей приспособления травянистых растений к обитанию на территориях, загрязненных тяжелыми металлами в результате деятельности промышленных предприятий.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Мета-анализ естественных факторов, детерминирующих приспособление растений из промышленно загрязненных территорий к избытку тяжелых металлов (с учетом влияния условий эксперимента на оценку металлоустойчивости);
2. Сравнительный анализ стратегий приспособления двух модельных видов (*Lychnis flos-cuculi* и *Deschampsia cespitosa*) из окрестностей медеплавильного завода к избытку меди в среде на основе сопоставления параметров дозовых зависимостей;
3. Сравнительный анализ влияния параметров среды и видовых особенностей трех модельных видов (*Agrostis capillaris*, *L. flos-cuculi* и *D. cespitosa*) на формирование пространственной структуры их ценопопуляций в зоне сильного загрязнения выбросами медеплавильного завода;
4. Анализ изменения генетической изменчивости *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения выбросами медеплавильного завода;
5. Анализ изменения частоты самоопыления *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения выбросами медеплавильного завода.

Научная новизна. Впервые с помощью процедур мета-анализа выполнено обобщение результатов тестов на металлоустойчивость травянистых растений импактных регионов, опубликованных за последние 50 лет, а также оценено влияние некоторых видовых характеристик растений и климатических параметров в районах их произрастания на металлоустойчивость. Впервые для оценки металлоустойчивости растений предложено использовать анализ трансформации зависимостей доза–эффект. Впервые для травянистых растений импактных регионов применены методы анализа пространственной автокорреляции для сравнения вкладов условий среды и механизмов распространения диаспор в формирование пространственной структуры их ценопопуляций. Впервые для *L. flos-cuculi* выполнен анализ измене-

ния генетического разнообразия в градиенте промышленного загрязнения, а также реконструирована история популяционно-генетических процессов на загрязненной территории. На основе специальной схемы отбора особей *L. flos-cuculi* из разных поколений с помощью анализа молекулярно-генетических маркеров оценен вклад самоопыления в частоту инбридинга на разных участках градиента загрязнения.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты анализа вклада разных факторов в формирование пространственной и генетической структуры популяций травянистых растений импактных регионов, а также полученные в работе оценки их металлоустойчивости вносят вклад в разработку стратегий восстановления и поддержания растительности нарушенных территорий. Полученные результаты заполняют ряд пробелов в знаниях о механизмах популяционно-генетических процессов приспособления к обитанию на загрязненных территориях и ставят новые задачи в области экологической генетики. Они демонстрируют преимущества использования специфических подходов к анализу данных в области экотоксикологии и пространственной экологии с целью минимизации потерь информации. По результатам мета-анализа методических факторов при оценке металлоустойчивости растений из импактных регионов даны рекомендации для проведения экотоксикологических экспериментов, а также сформулированы правила изложения результатов для их эффективного использования. База данных о металлоустойчивости разных видов растений, подготовленная автором на основе многочисленных разрозненных источников информации в ходе мета-анализа и представленная ко всеобщему доступу, делает возможным продолжение анализа металлоустойчивости растений специалистами разных направлений и с разных точек зрения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Дозовые зависимости, связывающие прирост корня с содержанием меди в питательной среде, различаются по форме или/и положению между популяциями из фоновых и импактных местообитаний. Такие различия дозовых зависимостей видоспецифичны, что свидетельствует о разных стратегиях адаптации к избытку тяжелых металлов.
2. На сильно загрязненных территориях вклад токсичности почвы и эндогенной автокорреляции в формирование пространственной структуры ценопопуляций различается у разных видов травянистых растений, что обусловлено разными механизмами распространения диаспор.
3. В истории ценопопуляций *L. flos-cuculi* на сильно загрязненной территории

зарегистрирован эффект основателя, повышенная частота инбридинга, а также отбор особей с повышенной металлоустойчивостью и компактной листовой пластинкой. Благоприятные условия для ауткроссинга, сложившиеся в последние годы в результате уменьшения промышленных выбросов, привели к снижению частоты инбридинга и самоопыления.

Степень достоверности и апробация результатов. Оценки металлоустойчивости *L. flos-cuculi* и *D. cespitosa* получены с помощью классического метода в экспериментальной экотоксикологии растений – корневого теста (Wilkins, 1957). Используемая при анализе генетической изменчивости *L. flos-cuculi* система микросателлитных маркеров ядерной ДНК была успешно апробирована на европейских популяциях *L. flos-cuculi*. Маркеры имеют высокую разрешающую способность и не имеют нуль аллелей. Исследование значительного по объему материала обеспечивает достоверность выводов в каждом разделе диссертационной работы. Кроме того математическому анализу данных уделена значительная часть работы. Так, в главе посвященной стратегиям адаптации разных видов к избытку тяжелых металлов, рассматривается более информативный подход к анализу зависимостей доза-эффект по сравнению с традиционно используемыми индексами толерантности. В главе, посвященной пространственной структуре ценопопуляций модельных видов в загрязненных местообитаниях, проводится сравнение оценок влияния различных предикторов на зависимую переменную, полученных несколькими способами: усредненные коэффициенты регрессии в мультимодельном выводе, доли изменчивости, вносимые предикторами или их группами в полную модель.

Результаты исследования были представлены на I Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, Украина, 2009); Всероссийской молодежной конференции «Эволюционная и популяционная экология: назад в будущее» (Екатеринбург, 2009); III Всероссийской научно-практической конференции «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования» (Н. Тагил, 2010); Всероссийской молодежной конференции «Экология: сквозь время и расстояние» (Екатеринбург, 2011); Всероссийской молодежной конференции «Экология: традиции и инновации» (Екатеринбург, 2012); Всероссийской молодежной конференции «Экология: теория и практика» (Екатеринбург, 2013); Всероссийской молодежной конференции «Экология: популяция, вид, среда» (Екатеринбург, 2014). Работа выполнена при поддержке Программы развития ведущих

научных школ (НШ-5325.2012.4 и НШ-2840.2014.4), Президиума УрО РАН (проекты поддержки молодых ученых 2009 г.; 11-4-НП-461; 13-4-НП-405) и РФФИ (12-04-32116; 14-04-31345).

Личный вклад автора. Автором лично выполнено планирование всех тематических блоков исследования. Полевой материал, необходимый для выполнения задач в каждом тематическом блоке, также собран автором лично. Автором самостоятельно выращены растения для получения материала для морфометрического и генетического анализа *Lychnis flos-cuculi*, а также проведены экспериментальные работы по оценке металлоустойчивости *L. flos-cuculi* и *Deschampsia cespitosa*; собраны литературные данные для мета-анализа; проведен анализ данных и выполнена интерпретация всех полученных результатов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы и 5 приложений. Работа изложена на 212 страницах, основной текст диссертации содержит 37 таблиц, и 44 рисунка. В приложениях представлено 18 таблиц и 2 рисунка. Список литературы включает 378 источников, в том числе 326 – на иностранных языках.

Благодарности. Я глубоко признательна д.б.н. Е.Л. Воробейчику за помощь на разных этапах работы – от планирования исследований до интерпретации и изложения результатов, а также к.б.н. В.С. Микрюкову за помощь при статистическом анализе во всех тематических блоках диссертации, за молекулярно-генетический анализ *L. flos-cuculi*, а также участие в полевых работах и обсуждении результатов. Также я выражаю искреннюю благодарность д.б.н. В.Н. Позолотиной, к.б.н. М.Р. Трубиной, к.б.н. Е.В. Антоновой, д.б.н. В.Л. Семерикову, к.б.н. С.А. Семериковой, д.б.н. В.С. Безелю, к.б.н. С.Ю. Кайгородовой, д.б.н. Д.В. Веселкину за полезные замечания в ходе выполнения работы. Хотелось бы отметить всестороннюю поддержку коллектива лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ ИЭРиЖ УрО РАН. Я благодарю к.б.н. И.Е. Бергмана и П.Г. Пищулина – за помощь при сборе почвенных образцов, к.б.н. А.И. Ермакова – за помощь при учете опылителей и определение насекомых, Э.Х. Ахунову, А.В. Щепеткина, И.А. Хлыстова и Т.Ю. Габерштейн – за химический анализ почвы, к.б.н. О.С. Дымшакову и к.б.н. М.В. Модорова – за помощь при генетическом анализе, а также П. Копиттке (Университет Квинсленда, Австралия) – за помощь в сборе данных для мета-анализа.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследуемая территория расположена к западу от Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ, Свердловская обл., г. Ревда), функционирующего с 1940 г. В выбросах СУМЗ преобладают SO_2 , HF, NO_x , Cu, Cd, Zn, Pb. Влияние завода на окружающую биоту многосторонне изучено (Воробейчик и др., 1994; Содержание тяжелых ..., 2014 и др.). Исследуемые участки расположены в четырех зонах загрязнения: фоновой, буферной-7 км, буферной-4 км и импактной (на расстояниях 30, 7, 4 и 1.5 км от завода, соответственно). Участки, как правило, представлены вторичными суходольными лугами, сформировавшимися на лесных полянах размером 300–5000 м² в результате вырубki леса более 50 лет назад (Нестерков, Воробейчик, 2009). Нами показано, что содержание обменных форм меди в почве участков буферных и импактной зон в 17, 30 и 400 раз выше, чем в фоновой (Дуля, 2005; Дуля и др., 2013). С приближением к заводу на участках снижается разнообразие, высота и обилие травостоя, уменьшается доля разнотравья и увеличивается доля злаков. Вместе с тем частота посещений *L. flos-cuculi* опылителями одинакова во всех зонах загрязнения.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главах 4–6 термином «популяция» обозначена группировка особей в пределах одной зоны загрязнения, изолированная чередой лесных массивов и удаленная от других аналогичных группировок на 3 км и более. Входящая в популяцию группа особей из одного местообитания, т.е. приуроченная к одному фитоценозу (как правило, это луг на лесной поляне) и отделенная лесным массивом протяженностью 50 м и более от других таких же групп, обозначена как «ценопопуляция».

Для анализа металлоустойчивости в 2006–2007 гг. в популяциях импактной, буферной-4 км и фоновой зон собрано по 7–11 особей *L. flos-cuculi* и 19–20 *D. cespitosa*, от которых в течение 15 мес. получено 59–184 и 399–417 вегетативных потомков, соответственно. По методике корневого теста для 3–10 концентраций меди в питательном растворе получены зависимости «прирост корня-концентрация меди». Всего получено 86 дозовых зависимостей.

Для анализа морфологических параметров листьев от 19–24 особей *L. flos-cuculi*, собранных в 2007 г. в каждой из четырех зон загрязнения, в течение

27 месяцев выращивания на выравненном экофоне получено вегетативное потомство, с которого отобраны зрелые листья (по 164–357 на зону загрязнения, всего 1056). Их цифровые изображения обработаны в ПО SIAMS Photolab v.4.0.4.x-r4679 (<http://siams.com>).

Для анализа пространственной структуры ценопопуляций *L. flos-cuculi*, *D. cespitosa* и *A. capillaris* в сентябре 2012 г. в импактной зоне на каждом из трех участках с разной относительной полнотой древостоя: (луг (0), редица (0.1–0.3), лес (0.5–0.7)) заложено по четыре трансекты длиной 25–50 м. Вдоль них через каждые 2 м расположены микроплощадки размером 0.5×0.5 м (всего 208). На каждой микроплощадке оценено проективное покрытие модельных видов, измерены микробиотопические характеристики (топографическое превышение, суммарный объем мохового яруса и лесной подстилки, удельная влажность почвы, балльная оценка влияния деревьев) и параметры химизма почвы (содержание N_{лг}, K₂O, P₂O₅, C_{общ} и обменных форм Cu, Cd, Pb, Zn).

Для анализа генетической изменчивости *L. flos-cuculi* в июле–августе 2012 г в импактной, буферной-4 км и фоновой зонах в девяти ценопопуляциях (по три на зону) проведен сбор семян, а также образцов листьев и стеблей со взрослых растений. Сбор семян был проведен отдельно из двух боковых цветов верхней и двух боковых цветов нижней ветви соцветия каждой материнской особи. В феврале 2013 г. в оптимальных условиях с каждого материнского растения было пророщено по 20 семян (по 5 семян из каждого цветка). С выросших растений собраны листья для генотипирования. Всего в генетический анализ включено 135 образцов родительского поколения и 1059 – потомства. Генотипирование проведено с помощью шести высоко изменчивых микросателлитных маркеров ядерной ДНК по методике (Characterization of microsatellite ..., 2002; Aavik *et al.*, 2012; Дуля, 2014).

Глава 3. МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ИЗ ЗОН ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ: МЕТА-АНАЛИЗ

Для мета-анализа мы осуществили поиск во всех доступных публикациях экспериментальных оценок металлоустойчивости травянистых видов, полученных с помощью корневого теста. Выполнено сравнение индексов толерантности популяций из фонового и загрязненного местообитаний, полученных в ходе выращивания растений при тестируемых концентрациях рассматриваемого элемента в питательной среде. На основе индексов толерантности рассчитана величина

эффекта (ES), в данном случае представляющая собой коэффициент линейной корреляции Пирсона между индексом толерантности популяции и содержанием исследуемого элемента в почве ее местообитания.

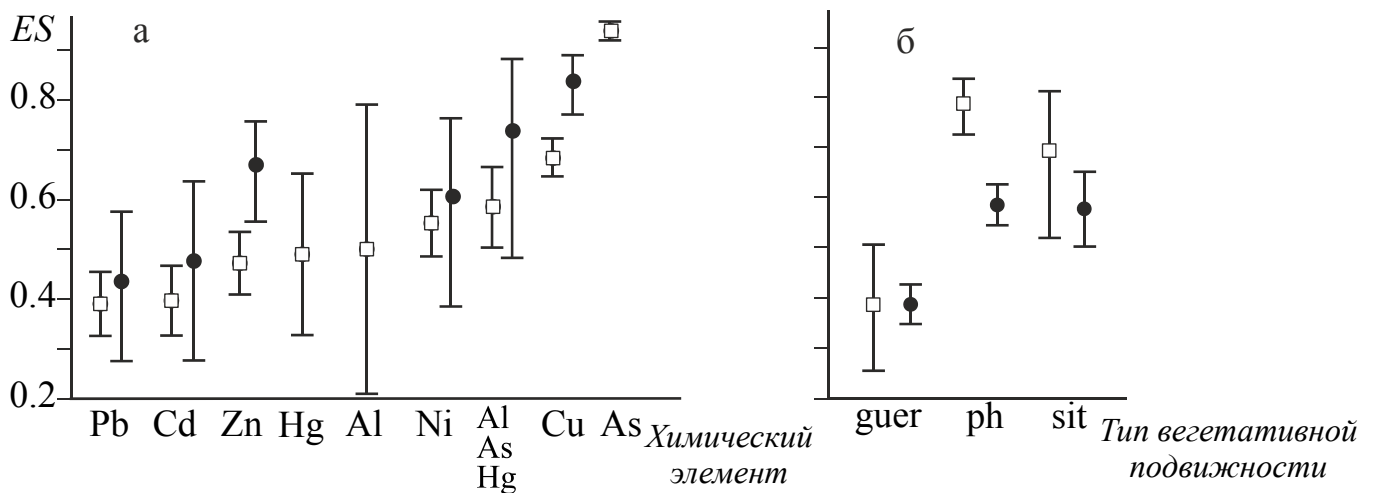
Наряду с оценками металлоустойчивости из публикаций и дополнительных источников была извлечена информация об условиях эксперимента, климате местообитаний исследуемых популяций, характеристиках изученных видов. На основе всей собранной информации сформирована база данных, включающая 201 значение ES для 24 видов растений, а также значения 17 предикторов ES (тестируемый элемент, концентрация металла в питательном растворе, продолжительность эксперимента, полнота питательной среды, биоклиматические переменные, вегетативная подвижность, минимальная и максимальная продолжительность жизни, таксономическая принадлежность на уровне семейства и клад по *APGIII*, микоризный статус, самосовместимость, тип опыления и максимальная плоидность). С помощью мультимодельного подхода рассчитаны усредненные коэффициенты линейной регрессии (β), связывающей ES с предикторами.

Низкие значения ES , т.е. небольшие различия по уровню металлоустойчивости между популяциями контрольных и загрязненных мест, установленные для типичных ксенобиотиков (Pb и Cd), свидетельствуют о высоком уровне преадаптации к ним в популяциях контрольных местообитаний (Рисунок 1а). Большие значения ES выявлены для биогенных элементов (Cu и Zn) и их аналога (As); они указывают на повышенную металлоустойчивость, возникшую под влиянием загрязнения.

ES вегетативно подвижных видов меньше, чем у растущих в форме плотного клона или неспособных к вегетативному размножению (Рисунок 1б), что согласуется с предположением о том, что вегетативно подвижные виды способны избегать бедные ресурсами или токсичные участки (Doust, 1981) и, соответственно, подвержены менее жесткому отбору по признаку металлоустойчивости на загрязненных территориях, чем неподвижные.

Рассчитанные по усредненной модели значения ES (т.е. при исключении влияния других предикторов) прямо пропорциональны максимально возможной плоидности вида ($\beta=0.10$, 95% ДИ [0.03–0.16], $p = 0.003$). Таким образом, различия по металлоустойчивости между популяциями загрязненных и чистых местообитаний более выражены у видов, способных к полиплоидизации, что согласуется с результа-

тами исследований связи между плоидностью и экологической пластичностью (Rothera, Davy, 1986; Nkongolo *et al.*, 2001; Kolar *et al.*, 2014).



Квадраты – оригинальные значения *ES*, точки – значения *ES*, предсказанные по усредненной модели с учетом изменчивости, вносимой другими предикторами; guer – длиннокорневищные виды, ph – коротkokорневищные, sit – не размножающиеся вегетативно

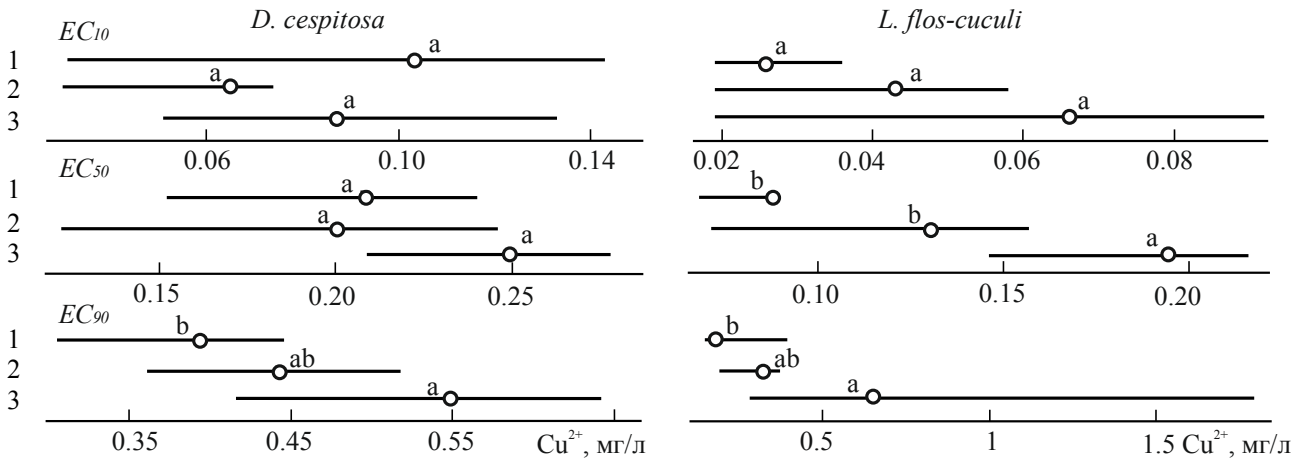
Рисунок 1 – Зависимость *ES* (а) от разных элементов, (б) от степени вегетативной подвижности вида

Глава 4. СТРАТЕГИИ АДАПТАЦИИ *D. CESPITOSA* И *L. FLOS-CUCULI* К ИЗБЫТКУ МЕДИ

Как правило, в работах, посвященных сравнительной оценке металлоустойчивости растений из чистых и загрязненных мест не выполняется анализ дозовых зависимостей, хорошо разработанный в классической токсикологии. Особенности формы кривой (угол наклона, ширина верхнего или нижнего плато, наличие отклонений от сигмоидальности) обусловлены спецификой влияния токсиканта на организм и механизмами адаптации к нему (Weltje, 2003; Dose-dependent ..., 2004; Дуля и др., 2013). Логично предположить, что у адаптированных организмов дозовая зависимость отличается от исходной (положением в диапазоне концентраций и/или формой). Соответственно, при переходе от дозовой зависимости в популяциях из чистых местообитаний к дозовой зависимости в популяциях загрязненных происходит ее трансформация. Мы предполагаем, что в основе особенностей трансформации лежат разные стратегии приспособления к избытку токсиканта (Дуля и др., 2013).

Для 28 особей *L. flos-cuculi* и 58 *D. cespitosa* из фоновой, буферной-4 и импактной зон с помощью корневого теста были получены дозовые зависимости «концентрация меди–пророст корня». По результатам их аппроксимации в список лучших моделей входили частные случаи модели Цедергрин-Рица-Штрайбига (Ritz,

Strebig, 2005), модель экспоненциального затухания, линейная функция, а также модели Вейбулла с разными формами асимметрии (Ritz, 2010). По усредненной модели с учетом весов Акаике рассчитаны эффективные концентрации меди (EC_{10} , EC_{50} и EC_{90}) и чувствительность (наклон линейного сегмента кривой), которые характеризуют положение и форму дозовой зависимости (Рисунок 2).



Приведены средние значения и 95%-ные доверительные интервалы; одинаковыми буквами для вида отмечены одинаковые EC_x между зонами

Рисунок 2 – EC_x в популяциях фоновой (1), буферной-4 км (2) и импактной (3) зон

При сравнении параметров зависимостей между популяциями разных зон загрязнения показано, что импактная популяция *D. cespitosa* демонстрирует повышенную устойчивость к концентрациям меди, находящимся в губительной части токсического диапазона, но не к концентрациям, слабо угнетающим рост. У растений из этой популяции также понижена чувствительность к меди. В противоположность этому повышенная устойчивость импактной популяции *L. flos-cuculi* выявлена во всем диапазоне концентраций, причем чувствительность одинакова во всех зонах (Дуля, 2009; 2010; Дуля и др., 2013). Приблизительно трансформация дозовых зависимостей исследуемых видов представлена на рисунке 3.

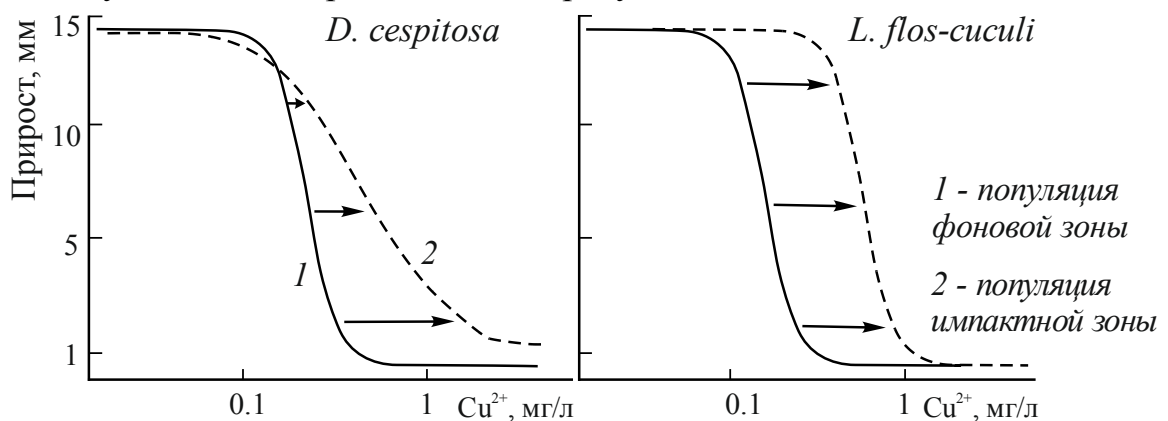


Рисунок 3 – Типы трансформации зависимостей доза–эффект при адаптации модельных видов к избытку меди

Глава 5. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА *A. CAPILLARIS*, *D. CESPITOSA* И *L. FLOS-CUCULI* В ПРОМЫШЛЕННО ЗАГРЯЗНЕННЫХ МЕСТООБИТАНИЯХ

Одна из характерных черт районов с повышенным содержанием тяжелых металлов – пятнистость растительности. Ее причинами могут быть неравномерность распределения в почве тяжелых металлов, гранулометрического состава почвы, ее влагоемкости, содержания Ca, N, P, K и др. (Barry, Clark, 1978; Hogan, Courtin, 19776; Дуля, 2006). Вместе с тем, пространственную структуру растительных сообществ и ценопопуляций определяют не только экзогенные факторы, но и эндогенные, т.е. обусловленные особенностями расселения видов. Эндогенные процессы – один из основных источников такого универсального свойства биотических систем, как пространственная автокорреляция (Legendre 1993; Fortin, Dale, 2005). В области экологии импактных регионов нет исследований, посвященных анализу эндогенной автокорреляции распределения травянистых растений.

Для характеристики пространственной автокорреляции показателей среды и параметров биотических сообществ широкое распространение получил метод *PCNM* (*principal coordinates of neighbor matrices*, Borcard, Legendre 2002), с помощью которого для разных фитоценозов показано, что факторы эндогенной автокорреляции детерминируют их пространственную структуру в такой же степени как гетерогенность среды (Dray *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2011). Несмотря на то, что эффективность *PCNM*-метода показана при исследовании многовидовых сообществ, населяющих гомогенные местообитания, он до сих пор не был применен при изучении пространственных процессов в импактных регионах, характеризующихся бедными видовым составом и высокой гетерогенностью условий.

На основе координат микроплощадок с помощью пакета *vegan* (Oksanen, 2014) и функции «*PCNM*» (Legendre *et al.* 2009) на каждом участке был создан 31–41 вариант пространственной автокорреляции (*PCNM*-компоненты). *PCNM*-компоненты, значимо коррелирующие с распределением обилия модельных видов (1–3 для вида на участке), представляют возможные варианты их эндогенной автокорреляции, т.е. могут быть обусловлены механизмами распространения. Эти *PCNM*-компоненты наряду с параметрами химизма почвы и микробиотопическими характеристиками микроплощадок использованы в качестве предикторов проективного покрытия исследуемых видов. По полной модели с помощью разбиения изменчивости (*variation partitioning*, Variation partitioning ..., 2006) проведен расчет долей изменчивости проективного покрытия, объясняемых группами предикторов (Рисунок 4).

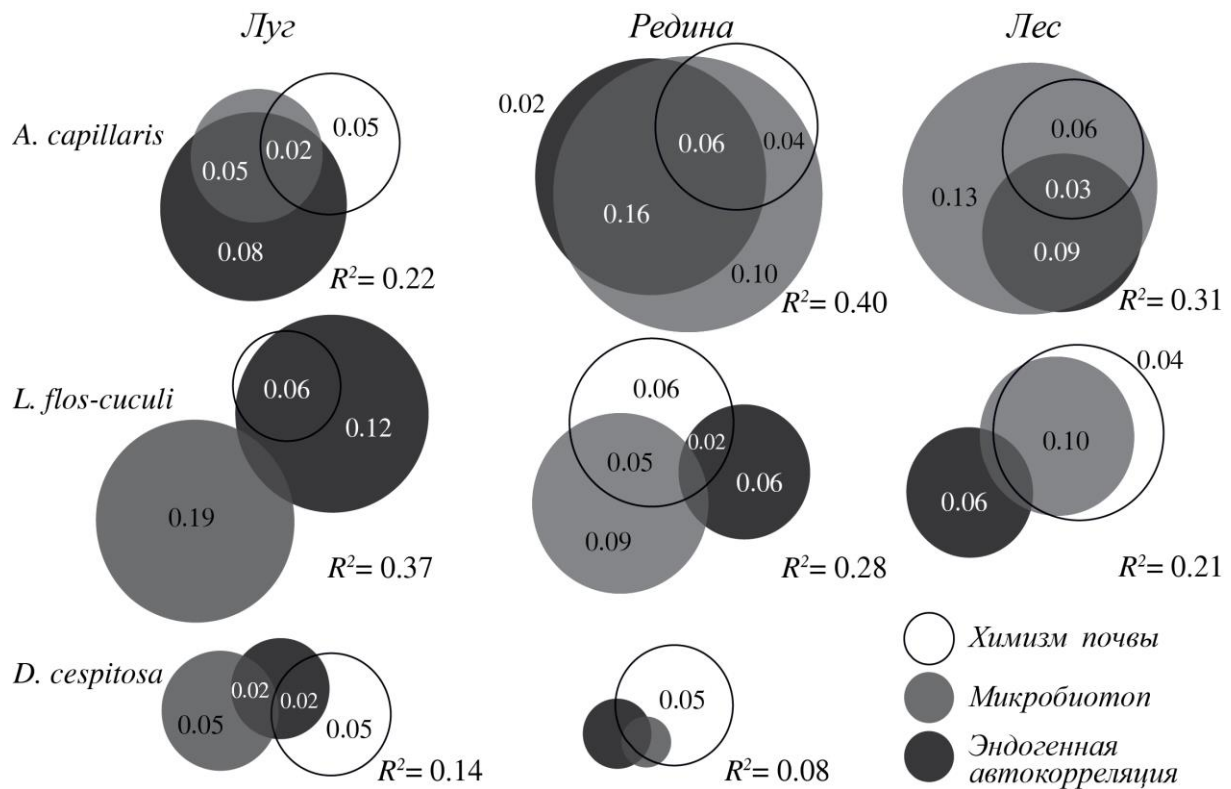


Рисунок 4 – Компоненты изменчивости проективного покрытия модельных видов, объясняемые группами предикторов на разных участках

Наибольший вклад эндогенной пространственной автокорреляции (т.е. PCNM-компонент), выявлен на открытом участке для *A. capillaris* (36% от R^2) и для *L. flos-cuculi* на всех участках (20–32%), для пространственной структуры ценопопуляций *D. cespitosa* наибольшую роль играют параметры химизма почвы, особенно токсичность.

Глава 6. ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ *L. FLOS-CUCULI* К ОБИТАНИЮ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

6.1 Генетическая изменчивость в популяциях растений из промышленно загрязненных местообитаний: постановка задачи

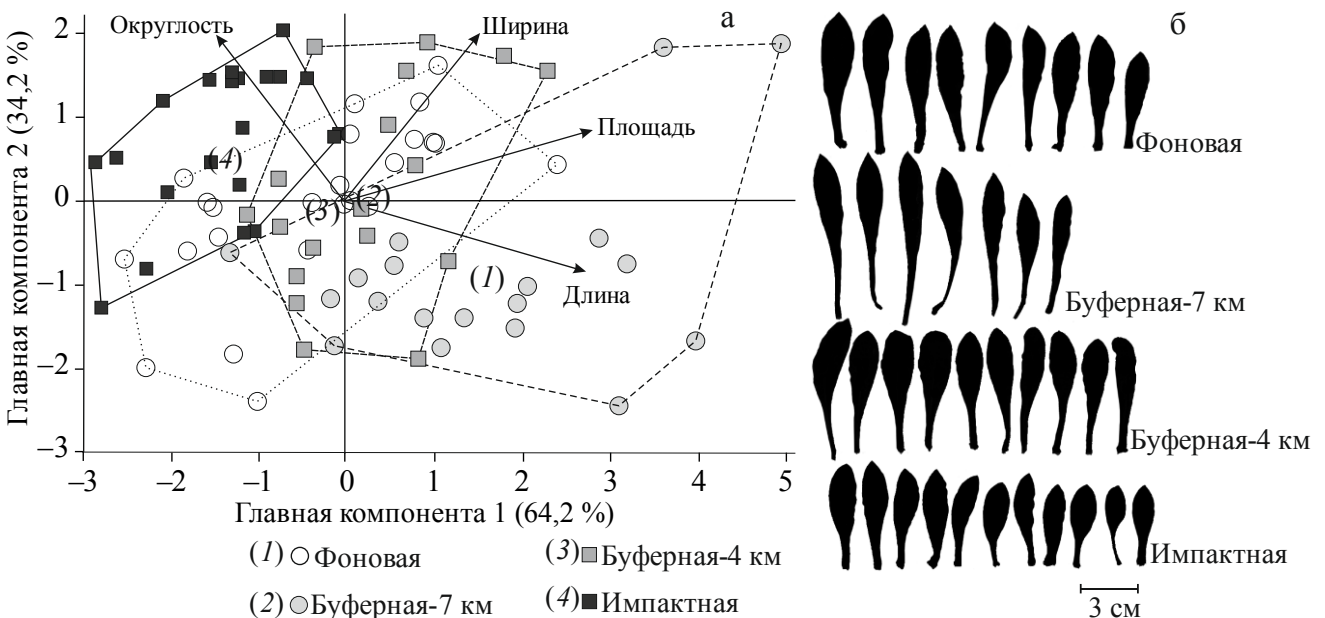
Результаты изучения генетического разнообразия популяций импактных регионов противоречивы: в одних работах показано, что на загрязненных участках оно ниже, чем на контрольных (Bush, Barrett, 1993; Vekemans, Lefebvre, 1997; Nordal *et al.*, 1999; Mengoni *et al.*, 2001; Дуля, 2014), что согласуется с предположениями о жестком отборе в условиях токсического стресса; в других – сделаны выводы о более сильном влиянии других факторов на внутривидовое генетическое разнообразие (например, межвидовой конкуренции) в чистых местообитаниях (Wu *et al.*, 1975a; Ducousso *et al.*, 1990). Такая противоречивость выявленных закономерностей затрудняет экстраполяцию на другие виды и требует как дальнейшего накопления информации, так и более углубленного изучения

механизмов регуляции генетического разнообразия в популяциях загрязненных территорий.

6.2 Морфологическая дифференциация популяций *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения

Для популяций *L. flos-cuculi* из четырех зон загрязнения проведено сравнение параметров формы и размеров листа их особей, выращенных в течение длительного времени в одних и тех же условиях. С использованием многомерного однофакторного дисперсионного анализа выявлено значимое влияние зоны загрязнения на морфологические расстояния между особями ($MS = 0.46$; $F(3; 82) = 18.15$; $p = 0.0001$; $R^2 = 0.41$). С помощью множественных сравнений показаны значимые различия между всеми зонами загрязнения, кроме фоновой и буферной-4 км.

С использованием анализа главных компонент (Рисунок 5а) наибольшие межгрупповые расстояния зафиксированы между буферной-7 км и импактной (0.41), а также буферной-7 км и фоновой (0.31) зонами. Минимальное расстояние (0.20) выявлено между фоновой и буферной-4 км зонами (сравнимо с внутригрупповыми расстояниями). Для буферной-7 км зоны характерны растения с наиболее длинными листьями, для импактной зоны – с наиболее компактной листовой пластинкой (Рисунок 5б).



Точка – особь, числа в скобках – центры популяций, векторы – факторные нагрузки на параметры листьев

Рисунок 5 – (а) результаты анализа главных компонент формы и размеров листа *L. flos-cuculi*, (б) типичные листья (листья особей расположенных вблизи центров)

Причины выявленной морфологической дифференциации *L. flos-cuculi* мы видим в отличиях по условиям увлажнения и освещенности нижних ярусов травостоя между исследуемыми зонами (Дуля, Микрюков, 2013).

6.3 Внутрипопуляционное генетическое разнообразие *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения: анализ на основе микросателлитных маркеров

По результатам генетического анализа маркеры в среднем имели по 9.3 аллели (3–21), и демонстрировали высокую чувствительность при идентификации генотипов (Дуля, 2014). Маркер *Cuculi13*, демонстрировавший полиморфизм в европейских популяциях *L. flos-cuculi* оказался мономорфным и был исключен из анализа. Аллельное разнообразие, а также доля гетерозигот как в родительском поколении, так и в потомстве в ценопопуляциях импактной зоны ниже, чем в буферной и фоновой (Таблица 1).

Таблица 1 – Параметры внутрипопуляционного разнообразия *L. flos-cuculi*

№ цено-популяции	Родительское поколение						Семенное потомство					
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>uHe</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>uHe</i>	<i>F_{IS}</i>
Фоновая зона												
1	6.6	4.22	1.57	0.75	0.76	-0.02	6.02	3.59	1.44	0.62	0.73	0.12
2	6.2	3.51	1.41	0.64	0.71	0.06	5.75	3.31	1.37	0.66	0.71	0.04
3	5.2	3.24	1.28	0.69	0.68	-0.07	5.49	3.18	1.28	0.63	0.66	0.02
Avg.	6	3.66	1.42	0.69	0.72	-0.01	5.75	3.36	1.36	0.63	0.70	0.06
Буферная-4 км зона												
1	6.8	4.21	1.54	0.73	0.74	-0.04	6.01	3.62	1.39	0.61	0.69	0.09
2	5.8	3.11	1.26	0.64	0.65	-0.03	5.58	3.10	1.26	0.60	0.64	0.03
3	7.2	4.16	1.59	0.81	0.76	-0.10	5.72	3.28	1.33	0.61	0.67	0.05
Avg.	6.6	3.82	1.46	0.73	0.71	-0.06	5.77	3.33	1.33	0.61	0.67	0.06
Импактная зона												
1	4.8	2.46	1.05	0.60	0.57	-0.10	4.31	2.52	1.01	0.57	0.55	-0.07
2	2.8	1.79	0.55	0.40	0.31	-0.24	3.51	1.84	0.70	0.44	0.39	-0.19
3	3.6	1.60	0.65	0.33	0.35	0.14	3.04	1.54	0.54	0.35	0.30	-0.22
Avg.	3.73	1.95	0.75	0.44	0.41	-0.07	3.62	1.97	0.75	0.45	0.41	-0.16

Примечание – *Na* и *Ne* – наблюдаемое и ожидаемое число аллелей, *I* – индекс Шеннона, *Ho* и *uHe* – наблюдаемая и несмещенная ожидаемая доля гетерозигот, *F_{IS}* – индекс фиксации Райта; *Avg.* – среднее для популяции, учетная единица – ценопопуляция

Это указывает на эффект основателя и повышенную частоту инбридинга в истории ценопопуляций импактной зоны. Вместе с тем, значения индекса фиксации Райта (*F_{IS}*) в этих ценопопуляциях, как правило ниже, чем в фоновой и буферной зонах, особенно в потомстве ценопопуляции 3, что свидетельствует о повышенной ча-

стоте ауткроссинга в ближайшем прошлом (Rousset, 2002). Повышение частоты ауткроссинга вероятно обусловлено увеличением плотности *L. flos-cuculi* в импактной зоне по сравнению с буферной и фоновой (Трубина, Дуля, 2007), которое вызвано уменьшением влияния кислотных выпадений на надземные части растений вследствие сильного снижения выбросов завода за последние 20 лет (Многолетняя динамика ..., 2014).

6.4 Генетическая дифференциация популяций *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения

На индивидуальную изменчивость приходится 90% от общей генетической изменчивости (Таблица 2); зона загрязнения, а также ценопопуляция вносят 9 и 2% в общую изменчивость, соответственно. Изменчивость внутри ценопопуляций очень низкая. При попарных сравнениях ценопопуляций показано, что значения оценок генетической дифференциации (F_{st}) между ценопопуляциями импактной зоны и остальных зон в среднем составили 0.15 (0.03–0.24), тогда как между ценопопуляцией фоновой и буферной зон – 0.02 (0–0.04). С учетом сходства между популяциями буферной и фоновой зон выявленная генетическая обособленность популяции импактной зоны вряд ли представляет собой следствие изоляции расстоянием. Скорее всего, это результат снижения ее генетического разнообразия, хотя не исключены другие формы изоляции (фенологическая, репродуктивная и др.) от популяций остальных зон.

Таблица 2 – Генетическая дифференциация (AMOVA, родительские растения)

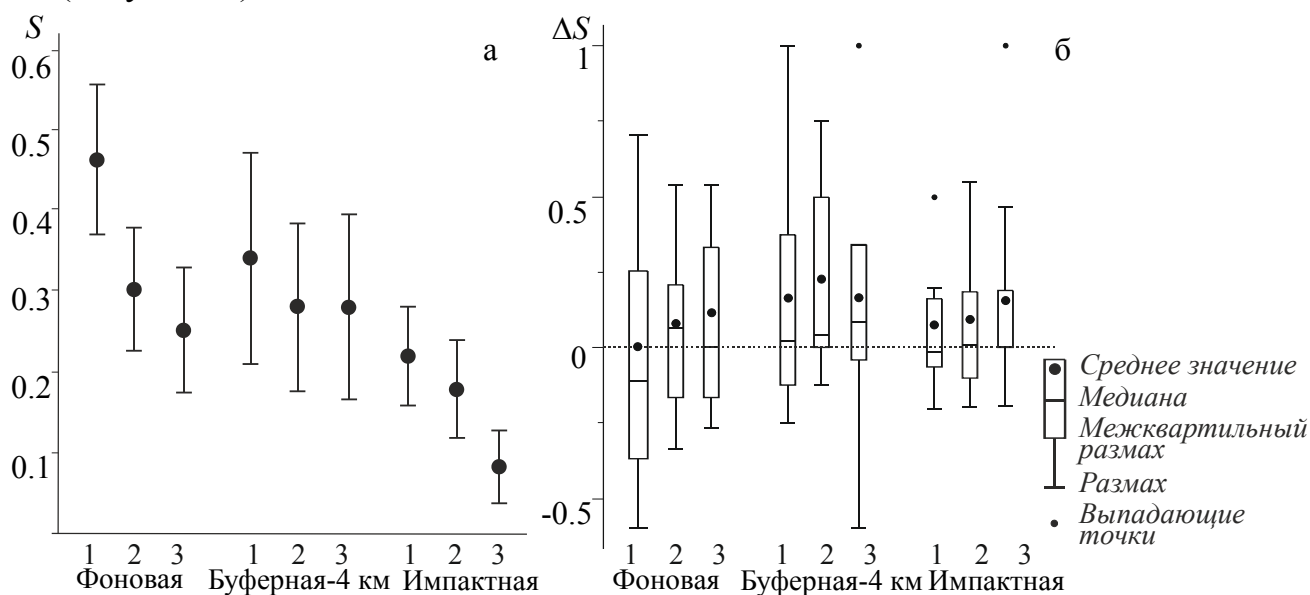
Показатель дифференциации	Величина показателя	<i>p</i>
F_{rt} (межпопуляционная)	0.086	0.003
F_{st} (между всеми ценопопуляциями)	0.104	0.001
F_{sr} (между ценопопуляциями внутри популяций)	0.019	0.004
F_{is} (между особями в ценопопуляциях)	-0.006	0.601
F_{it} (между всеми особями)	0.098	0.001

Примечание – *p* – достигнутый уровень значимости (перестановочный тест с 999 перестановками с учетом иерархической структуры выборок)

6.5 Пластичность репродуктивной системы *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения

Оценка вклада самоопыления в степень инбридинга в популяциях проведена с помощью метода реконструкции родственных отношений (*reconstructed progeny array*, Wang *et al.*, 2012). Расчет заключается в проверке разных моделей отношений отец-потомок, построенных на данных о генотипах потомков, их материнских растений, дополнительных взрослых особей, а также предполагаемых взрослых особей, чьи генотипы рассчитаны на основе частот аллелей в ценопопуляциях. По результа-

там анализа частота самоопыления оказалась ниже в ценопопуляциях импактной зоны (Рисунок 6а).



На рисунке (а) указаны средние значения и 95%-ные доверительные интервалы, по оси абсцисс указаны номера ценопопуляций

Рисунок 6 – (а) частота самоопыления, (б) разница по частоте самоопыления между нижними и верхними частями соцветия

Поскольку *L. flos-cuculi* – протандричный вид, к тому же характеризующийся последовательным зацветанием цветов на соцветии, то более рано раскрывшиеся цветки могут испытывать дефицит чужеродной пыльцы, поэтому при снижении плотности (размера) популяции или недостатке опылителей дефицит пыльцы ранних цветков должен быть более ярко выражен и частота самоопыления в них повышена (Brunet, Charlesworth, 1995; Buide, 2002). На основе информации о частоте самоопыления в цветках из разных частей соцветия проведена сравнительная оценка дефицита пыльцы в популяциях *L. flos-cuculi* разных зон загрязнения. Частота самоопыления выше в рано раскрывающихся цветках, чем в поздних, однако эта разница одинакова в разных зонах загрязнения (Рисунок 6б), следовательно, дефицит пыльцы не меняется в градиенте загрязнения.

ВЫВОДЫ

1. На основе мета-анализа экспериментальных работ по экотоксикологии показано, что уровень преадаптации травянистых растений к избытку разных элементов неодинаков: он выше для ксенобиотиков (Pb, Cd) и ниже для биогенных элементов (Cu, Zn) и их аналогов (As). Степень металлоустойчивости травянистых растений из окрестностей промышленных предприятий прямо пропорциональна максимально

возможному уровню ploидности вида и обратно пропорциональна вегетативной подвижности.

2. Дозовые зависимости, связывающие прирост корня с содержанием меди в питательной среде, различаются по форме или/и положению между популяциями из фоновых и загрязненных местообитаний. Такая трансформация дозовых зависимостей свидетельствует об адаптации популяций из загрязненных мест к избытку тяжелых металлов.

3. Характер трансформации дозовых зависимостей разных видов различается: при переходе от ценопопуляций фоновой территории к ценопопуляциям сильно загрязненной территории для *Lychnis flos-cuculi* характерен «параллельный перенос», при котором форма кривой доза-эффект не меняется (т.е. устойчивость увеличивается во всем диапазоне концентраций меди), тогда как для *Deschampsia cespitosa* устойчивость увеличивается только в области высоких концентраций. Разные типы трансформации могут свидетельствовать о различных стратегиях адаптации к избытку тяжелых металлов.

4. Механизмы формирования пространственной структуры ценопопуляций травянистых растений в промышленно загрязненных местообитаниях различаются у разных видов по соотношению вкладов внешних факторов и эндогенной автокорреляции. Для *L. flos-cuculi* выявлена максимальная пространственная автокорреляция, обусловленная локализацией семенного потомства вблизи материнского растения и вегетативным размножением. Пространственное распределение *Agrostis capillaris* в большей степени обусловлено влиянием деревьев-эдификаторов, а *D. cespitosa* – химизмом почвы.

5. Выявлена существенная морфологическая дифференциация популяции *L. flos-cuculi* сильно загрязненной территории от популяций умеренно загрязненной и фоновой территорий по форме и размерам листа, что свидетельствует об отборе в условиях промышленного загрязнения особей с компактной листовой пластинкой.

6. С использованием шести микросателлитных маркеров ядерной ДНК в ценопопуляциях *L. flos-cuculi* сильно загрязненной территории обнаружены свидетельства эффекта основателя (пониженное аллельное разнообразие и низкая частота гетерозигот), который привел к их значительной генетической дифференциации от ценопопуляций фоновой и умеренно загрязненной территорий.

7. Частота инбридинга в ценопопуляциях *L. flos-cuculi* сильно загрязненной территории снижена по сравнению с фоновой и умеренно загрязненной территориями,

что обусловлено ослаблением барьеров для потока генов между ценопопуляциями вследствие изреживания лесных массивов, элиминацией конкурентов за опылителей, а также высокой плотностью *L. flos-cuculi* на сильно загрязненной территории.

8. Самоопыление у *L. flos-cuculi* служит механизмом устойчивости функционирования ценопопуляций в неблагоприятных для перекрестного опыления условиях (низкая плотность, повышенная конкуренция за опылителей с другими луговыми видами, наличие барьеров для переноса пыльцы и семян из густых лесных массивов между соседними ценопопуляциями). Частота самоопыления в ценопопуляциях *L. flos-cuculi* сильно загрязненной территории ниже по сравнению с фоновой и умеренно загрязненной территориями, что не позволяет рассматривать самоопыление у этого вида в качестве механизма фиксации аллелей устойчивости к загрязнению.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

Дуля О.В. Стратегии адаптации *Deschampsia caespitosa* и *Lychnis flos-cuculi* к загрязнению тяжелыми металлами: анализ на основе зависимости доза–эффект / О.В. Дуля, В.С. Микрюков, Е.Л. Воробейчик // Экология. – 2013. – № 4. – С. 243–253.

Дуля О.В. Изменение формы и размера листьев *Lychnis flos-cuculi* L. в градиенте полиметаллического загрязнения / О.В. Дуля, В.С. Микрюков // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2013. – Т.18, № 3. – С. 778–783.

Публикации в других изданиях:

Дуля О.В. Генетическая изменчивость *Lychnis flos-cuculi* в градиенте промышленного загрязнения // Экология: популяция, вид, среда: материалы конф. молодых ученых, 14–18 апр. 2014. – Екатеринбург: Академкнига, 2014. – С. 40–48

Дуля О.В. Влияние методических факторов на результаты экотоксикологических экспериментов: мета-анализ / О.В. Дуля, В.С. Микрюков // Экология: сквозь время и расстояние: материалы конф. молодых ученых, 11–15 апр. 2011. – Екатеринбург: Академкнига, 2011. – С. 60–68.

Дуля О.В. Металлоустойчивость популяций *Lychnis flos-cuculi* из зон с разными уровнями промышленного загрязнения // Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования: материалы III всероссийской научно-практической конф., 1–5 мар. 2010. – Нижний Тагил: НТГСПА, 2010. – Ч. 1. – С. 175–179.

Дуля О.В. Токсикотолерантность *Coronaria flos-cuculi* (L.) A. Вг. из разных зон влияния выбросов медеплавильного комбината // *Фундаментальные и прикладные исследования в биологии: материалы I междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых*, 23–26 февр. 2009 – Донецк: Вебер, 2009. – Ч. 1. – С. 319–320.

Трубина М.Р. Особенности изменения численности локальных популяций и характера размещения особей луговых видов в окрестностях медеплавильного завода / М.Р. Трубина, **О.В. Дуля** // *Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель: материалы междунар. конф.*, 4–8 июн. 2007. – Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2007. – С. 639–649.

Дуля О.В. Металлоустойчивость семенного потомства щучки дернистой из зоны влияния металлургического комбината // *«Экология: от генов до экосистем»: материалы конф. молодых ученых*, 25–29 апр. 2005. – Екатеринбург: Академкнига, 2005. – С. 63–67.

Подписано в печать 06.02.15
Формат 60×84 1/16. Объем 1 авт. л.
Тираж 100 экз. Заказ № 253

Отпечатано в типографии ОАО «ИВЦ»
620142 г. Екатеринбург, ул. Цвиллинга, 4, тел. (343) 260-40-42