



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУН Института экологии
растений и животных УрО РАН
д.б.н. М.Г. Годоватин

« 13 » декабря 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Казаковой Елизаветы Александровны** на тему
«Анализ генетической структуры и антиоксидантного статуса хронически
облучаемых популяций сосны обыкновенной», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.01 – «Радиобиология»

Актуальность исследования

Диссертация Казаковой Е.А. посвящена решению одной из важнейших радиобиологических проблем – оценке отдалённых последствий крупных радиационных аварий в природных популяциях растений, в течение длительного времени обитающих на радиоактивно загрязнённых территориях. Актуальность темы определяется тем, что на планете уже существует много обширных зон, загрязнённых радионуклидами и вероятность появления их в будущем не исключается. В результате аварии на Чернобыльской АЭС радиоактивному загрязнению подверглись огромные площади лесных насаждений, причём максимальное радиационное воздействие пришлось на весенне-летние месяцы, когда растения наиболее уязвимы. Особенно сильно пострадали хвойные деревья, обладающие высокой радиочувствительностью. Последующие 30 лет леса в зоне радиоактивного следа произрастают в условиях хронического низкодозового облучения. Последствия такого облучения исследуются на разных видах, и проблема остается предметом острых дискуссий. В диссертации представлены результаты анализа действия хронического облучения на генетическую структуру и антиоксидантный статус популяций сосны обыкновенной, произрастающих на территории радиоактивного следа, возникшего в результате аварии на ЧАЭС.

Тема диссертации полностью соответствует заявленной научной специальности – 03.01.01 - «Радиобиология», охватывающей такие области исследований как последствия ядерных катастроф и радиозэкология (п. 9), принципы и методы радиационного мониторинга (п. 10), отдалённые последствия действия излучений, хроническое действие радиации, особенности биологического действия малых доз облучения (п. 11).

Цель работы и задачи исследования сформулированы четко, работа выполнялась в рамках избранной темы. Собран достаточный материал в природных фитоценозах в градиенте радиоактивного загрязнения. Методология исследования обоснована, исходя из известных закономерностей ответных реакций растений на радиационное воздействие. Решение задач выполнено с использованием современных аналитических методов, адекватных поставленной цели. Для описания полученных результатов автор использовала современные методы статистического анализа.

Научная новизна

Впервые проведен комплексный анализ генетической структуры и антиоксидантного статуса выборок сосны обыкновенной, произрастающих в течение 30 лет в условиях радиоактивного загрязнения в зоне аварии на ЧАЭС. Оценка генетических последствий хронического облучения выполнена с использованием аллозимного анализа. Показана связь аллельного разнообразия метаболических ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и лейцинаминопептидазы) с мощностью поглощённой дозы. В частности установлено увеличение частоты мутаций в изоферментных локусах. При этом активность метаболических ферментов в эндоспермах семян сосны обыкновенной значительно не изменялась в исследованном диапазоне доз.

Впервые оценен антиоксидантный статус деревьев из хронически облучаемых сосновых насаждений. Для этого проанализированы концентрации малонового диальдегида (продукта перекисного окисления липидов) в хвое, а также концентрации низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона и аскорбиновой кислоты). Облучение с мощностью дозы 102.4–129.2 мГр/год приводит к изменению работы антиоксидантных систем, а выявленные изменения играют роль в адаптации популяций к хроническому радиационному воздействию.

Теоретическое и практическое значение

Теоретическая значимость работы обусловлена тем, что в результате анализа оригинальных натуральных данных выявлены фундаментальные механизмы адаптации древесных растений к хроническому радиационному воздействию. Полученные результаты создают научную основу для прогноза дальнейшей судьбы хвойных лесов, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях. Практическая значимость работы связана с возможностью использования результатов для разработки российских и международных нормативных документов, на которых основывается радиационная безопасность биоты. Результаты работы соискателя включены в учебный процесс ИАТЭ НИЯУ МИФИ (дисциплина «Радиационная генетика»).

Личный вклад соискателя

Казакова Е.А. принимала непосредственное участие в формулировке целей и задач исследований, в планировании экспериментов. Она самостоятельно выполнила

электрофоретический и спектрофотометрический анализы, а в выполнении хроматографического анализа принимала активное участие. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка, интерпретация полученных данных и написана диссертационная работа. Казакова Е.А. участвовала в подготовке публикаций и в представлении результатов на научных конференциях.

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, 3 из них статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Содержание диссертации соответствует опубликованным работам. Текст автореферата полностью соответствует содержанию диссертации. Основные результаты апробированы автором на 10 международных и всероссийских тематических конференциях.

Оценка содержания диссертации

Структура и объём диссертационной работы. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка использованной литературы, включающего 336 источников, из них 204 на иностранном языке. Диссертация изложена на 166 страницах, содержит 18 таблиц и 22 рисунка.

Во введении обсуждаются актуальность и степень разработанности темы, формулируются цель и задачи исследования, описывается его научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость. Кратко изложены методология и методы исследований, обоснованы методы оценки достоверности результатов и соответствие диссертации выбранной специальности. Здесь же представлены положения, выносимые на защиту, апробация результатов и личный вклад автора в выполнение работы. Замечаний к этой важной части работы нет.

Глава I «Обзор литературы». На основе анализа отечественной и зарубежной литературы автор рассматривает закономерности изменения генетической структуры популяций растений в ответ на стрессовые воздействия. Проанализированы генетический подход к изучению структуры популяций, экологические факторы, влияющие на генетические процессы, особенности реакции растений на воздействие ионизирующих излучений. Обоснован методологический подход исследования радиационных эффектов на разных уровнях организации живого. Описаны закономерности радиобиологических реакций, полученные в крупномасштабных экспериментах и в зонах крупнейших аварий. Обсуждается роль антиоксидантных систем в поддержании гомеостаза растений в условиях окислительного стресса. Глава содержит таблицы и схемы, в которых обобщаются установленные закономерности.

Следует отметить свободное и точное оперирование автором основными генетическими, биохимическими и радиобиологическими понятиями, прекрасное знание современных литературных источников по обсуждаемым проблемам, как русских, так и иностранных. Глава заканчивается кратким заключением по обзору, обобщающим основные положения, подробно изложенные в главе. Из заключения логично вытекает обоснование актуальных задач, которые рассмотрены в диссертации.

Глава II «Материалы и методы». В главе дается подробное описание объекта исследования – сосны обыкновенной, которая рекомендована Международной комиссией по радиационной защите в качестве референтного вида при оценке последствий облучения для природных экосистем [ICRP, 2007]. Детально описаны район исследования и реперные участки, а также методы отбора проб почвы, шишек и хвои. Детально описан способ расчета мощности поглощенных доз. Приведено подробное описание метода аллозимного анализа, а также спектрофотометрического анализа активности ферментов, хроматографического анализа антиоксидантов и малонового диальдегида. Особое внимание уделено методам математической обработки экспериментальных данных. В качестве замечания отметим, что методы определения содержания радионуклидов, в частности ^{90}Sr , требуют большей детализации.

Глава III «Результаты» включает несколько разделов. В первом разделе приведены данные об уровнях техногенного загрязнения участков. Показано, что в зоне загрязнения содержание радионуклидов превышает фоновый уровень на 2–3 порядка величин. Во втором разделе представлен анализ аллельного разнообразия, частоты мутаций, генетической подразделенности изученных выборок. Третий раздел включает анализ активности ферментов. В четвертом разделе показаны результаты по концентрациям низкомолекулярных антиоксидантов и малонового диальдегида.

К этой части работы имеются вопросы и замечания:

1) На стр. 83 указано, что значимость различий оценивали с использованием критерия Стьюдента. Значит ли это, что сравнение выборок по частотам аллелей осуществляли также по этому критерию, а не с помощью χ^2 ?

2) Таблица 3.5, колонка «Частота аллеля». Не ясно, что обозначает «0 + 0.077», «1 – 0.167», «0 + 0.056» и т.д. Если аллель в популяции отсутствует («0») или локус мономорфный («1»), то статистическая ошибка не приводится. Поясните, если это теоретические расчеты.

3) Каким методом построена дендрограмма на рис. 3.4., касающаяся генетической дифференциации исследуемых популяций? В ней не указаны уровни бутстреп-поддержки.

4) К сожалению, результаты работы отделены от обсуждения, поэтому, переходя к следующей главе, приходится постоянно обращаться к таблицам и рисункам предыдущей главы.

Глава IV «Обсуждение» Раздел 1. Анализируя полученные результаты по накоплению радионуклидов в почвах и шишках сосны, автор приходит к выводу, что они не противоречат литературным данным. Почвы всех экспериментальных участков были близки по физико-химическим свойствам, а содержание тяжёлых металлов в них не превышало допустимых уровней. Оценённые для семян сосны дозы (10.7–129.2 мГр/год) оказались ниже установленного порога, при котором можно ожидать статистически значимые биологические эффекты, однако представленные далее результаты свидетельствуют об обратном.

Раздел 2. Для оценки генетического разнообразия популяций сосны диссертант выбрал 3 ферментные системы, которые представлены 9 локусами (Lar-2 не исследован, о чем авторы упоминают в дискуссии, поэтому оценена изменчивость 8 локусов, 7 из которых полиморфны). Локусы кодируются 32 аллелями. В исследовании выявлено, что с ростом мощности дозы хронического облучения (10.7–39.3 мГр/год) в популяциях сосны статистически значимо возрастает общая частота мутаций в изоферментных локусах, главным образом за счет нуль-мутаций. Результаты согласуются с данными других исследований, выполненных в зоне Чернобыльской аварии, а также в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа. Отмечено, что полученные данные подтверждаются на этих же выборках сосны методом AFLP-маркёров, а также аллозимным анализом антиоксидантных ферментов. О значимом радиационном влиянии свидетельствуют работы (Kovalchuk et al., 2003; Volkova et al., 2018), в которых показаны эпигенетические изменения в геномах сосны.

В изученных популяциях сосны полиморфность ферментных локусов была высока (от 60.0 до 93.3%), но уровень полиморфизма не зависел от мощности дозы. Уровень полиморфизма зависит от набора используемых маркёров, от условий произрастания популяций, поэтому представленные результаты не противоречат известным фактам. Наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую, а индекс фиксации Райта имел высокие отрицательные значения, что свидетельствует об избытке в выборках гетерозигот. Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность на самом загрязнённом участке была статистически значимо выше, чем в контроле. Подобные закономерности были показаны ранее в локусах антиоксидантных ферментов. F_{st} свидетельствует, что 96% генетической изменчивости у сосны реализовалось внутри популяций. Изученные выборки характеризуются высоким и средним уровнем внутривнутрипопуляционного разнообразия, выявлена значимая корреляция данного показателя с радиационным воздействием. Сегрегация по диаллельным локусам ферментов не нарушена. Кластерный анализ разделил изученные выборки на две группы, отличающиеся по уровню радиационного воздействия. Обнаружена статистически значимая корреляция эффективного числа аллелей с мощностью дозы (на наиболее загрязнённом участке). Диссертант предполагает, что эти феномены обусловлены реакцией деревьев на радиационный стресс.

Эта часть работы вызвала наибольшие дискуссии. Имеются замечания и предложения:

1) Диссертант отметила, что полученные различия могут быть связаны не только с хроническим радиационным воздействием, но и с географическим расположением популяций. К этому можно добавить, что важно учитывать происхождение лесов. Если они были созданы на основе лесопосадок, исходно посадочный материал мог генетически различаться.

2) Вызвали дискуссию данные таблицы 3.7. Разброс значений показателей ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности очень высок (0.299–0.653). В опубликованной литературе по аллозимной изменчивости сосны обыкновенной, за редким исключением, эти показатели не превышают значений 0.200–0.320.

В обсуждении соискатель приводит одну из возможных причин этого явления – возраст деревьев. Однако у всех исследуемых деревьев возраст не превышает 30–50 лет (табл. 2.1.). Исследование возрастной динамики генетической изменчивости в популяциях сосны меловой, показало, что средняя наблюдаемая гетерозиготность у деревьев в возрасте 25–35, 40–80 лет была выше, чем у зародышей (0.183–0.207), однако она не превышала 0.307–0.311 (Коршиков & Мудрик 2006).

Вторая, приведенная в обсуждении возможная причина повышенной гетерозиготности – небольшое число (8) изученных локусов. В то же время в тех же самых популяциях сосны был проведен анализ с использованием всего 3–4 локусов (антиоксидантные ферменты) (Geras'kin & Volkova 2014), который показал результаты, более согласующиеся с литературными данными.

Имеется еще одна возможная причина повышенной гетерозиготности (она не обсуждается диссертантом) – разная интенсивность радиального прироста ствола деревьев (Коршиков & Багдасарова 2014).

В дальнейшем можно провести более детальный анализ данных таблицы 3.5, указав наличие специфических аллелей, присущие только определенным выборкам, не объединять все локусы при оценке эффективного числа аллелей, редких аллелей, поскольку объединение уничтожает качественную индивидуальность каждой выборки.

3) Стр. 122. Не совсем ясно, что соискатель имела в виду, написав «... реализация преобладающей части изменчивости в пределах популяции ...», а также что понимается под «генотипом популяции»? (стр.125).

4) Таблица 4.1. В названии правильнее было бы написать «по шести ферментным системам (LAP, MDH, G6PD и SOD, GR, GPX)», вместо «по шести локусам изученных ферментов LAP, MDH, G6PD и SOD, GR, GPX», поскольку локусов было исследовано гораздо больше.

Раздел 4. Автор подробно анализирует проблему изменения активности различных ферментных систем у растений, находящихся под действием того или иного стресса. В диссертации показано, что активность ферментов G6PD, MDH и LAP не зависела от уровня поглощённой генеративными органами сосны дозы. Вероятно, мощность излучения недостаточна для изменения активности этих ферментов. Ранее было показано, что активность антиоксидантных ферментов в этих же выборках сосны также не изменялась.

В выборке сосны, произрастающей на одном из наиболее загрязнённых участков в Беларуси (102.4 мГр/год), зафиксировано увеличение концентрации малонового диальдегида. При этом изменения содержания аскорбиновой кислоты ни в одной популяции не наблюдалось. Обнаружена значимая корреляция ($r = 0.71$, $p < 0.05$) соотношения GSH/GSSG с уровнем радиационного воздействия.

Заключение. В этом разделе подведены краткие итоги в работы, подчеркнуты новизна полученных данных и перспективы дальнейших исследований.

Выводы. Необходимо отметить высокую степень достоверности каждого из семи выводов, которая обусловлена большим объемом фактического материала, его адекватной статистической обработкой и вдумчивым анализом результатов с учетом литературных данных.

Заключение

Указанные замечания не уменьшают научной и практической значимости работы, не затрагивают ее основных выводов и не влияют на общую положительную оценку выполненной автором работы. Диссертация Казаковой Е.А. «Анализ генетической структуры и антиоксидантного статуса хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной» является самостоятельным, комплексным и законченным исследованием. По актуальности, новизне, научной и практической значимости полученных результатов, объёму выполненной автором работы диссертация удовлетворяет требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а автор – **Казакова Елизавета Александровна**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01. – «Радиобиология».

Отзыв на диссертацию обсужден и утвержден на заседании Ученого Совета ФГБУН Института экологии растений и животных Уральского отделения РАН от 13 декабря 2018 г., протокол № 5.

(Адрес ИЭРиЖ УрО РАН: ул. 8 Марта, 202, к. 3, Екатеринбург, 620144.

Тел.: (343) 260-82-56; e-mail: common@ipae.uran.ru ; сайт <http://ipae.uran.ru>).

Заведующая лабораторией популяционной радиобиологии
ИЭРиЖ УрО РАН,
доктор биологических наук

В.Н. Позолотина

Ученый секретарь ИЭРиЖ УрО РАН,
кандидат биологических наук

Т.С. Ослина

Подпись 
Заверяю 
Нач. общего отдела ИЭРиЖ УрО РАН

