

На правах рукописи



Волкова Полина Юрьевна

**АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО
ИЗЛУЧЕНИЯ В НИЗКИХ ДОЗАХ**

03.01.01 – Радиобиология

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Обнинск – 2020

Работа выполнена в **Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»**

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Доктор биологических наук, профессор

Гераськин Станислав Алексеевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Гудков Игорь Николаевич

Доктор биологических наук, профессор, академик Национальной академии аграрных наук Украины, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, профессор кафедры радиобиологии и радиоэкологии

Позолотина Вера Николаевна

Доктор биологических наук, профессор, Институт экологии растений и животных УрО РАН, заведующая лабораторией популяционной радиобиологии

Рубанович Александр Владимирович

Доктор биологических наук, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, заведующий отделом генетической безопасности

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России

Защита состоится «12» мая 2020 г. в _____ час. _____ мин. на заседании диссертационного совета Д 006.068.01 по радиобиологии при Федеральном государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» по адресу: 249032 Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км, ФГБНУ ВНИИРАЭ, здание 1, к. 510. Факс: (484) 396-80-66. Электронная почта: rirae70@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ВНИИРАЭ, <http://www.ds.rirae.ru>

Автореферат разослан «_____» 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

Шубина Ольга Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Сохранение стабильности биосфера и обеспечение продовольственной безопасности в условиях усиливающегося антропогенного загрязнения и ускоряющихся климатических изменений являются важными научными и практическими задачами. Изучение молекулярных основ адаптивных реакций культурных и дикорастущих растений является фундаментальной проблемой, решение которой позволит повысить эффективность экологической ремедиации и создать новые устойчивые и продуктивные сорта сельскохозяйственных культур (Shao et al., 2009; Mickelbart et al., 2015). Ионизирующее излучение (ИИ) представляет собой стрессовый фактор физической природы, действующий на клетки растений как прямым, так и косвенным образом. Молекулярные пути, опосредующие реакцию растений на низкодозовое облучение, являются в настоящее время предметом интенсивного изучения. Полевые исследования эффектов хронического радиационного воздействия создают научную основу для прогноза отдалённых последствий хронического облучения биоты. В фундаментальном аспекте подобные работы позволяют получить уникальные данные о молекулярных механизмах адаптации природных популяций растений к многолетнему антропогенному воздействию и прогнозировать дальнейшее состояние популяций растений, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях. Изучение молекулярных, биохимических и физиологических изменений в популяциях растений, произрастающих в условиях хронического облучения, вносит вклад в разработку принципов и методов оценки состояния биоценозов и в обеспечение стабильного существования природных экосистем в условиях техногенеза.

Работы по расшифровке механизмов действия излучения в низких дозах на сельскохозяйственные культуры вносят вклад в обеспечение продовольственной безопасности, вышедшее на первый план в условиях ускоряющихся изменений климата. С одной стороны, перед исследователями стоит задача по разработке новых стратегий адаптации существующих сельскохозяйственных культур к климатическим изменениям (Rosenzweig et al., 2014), а с другой стороны необходимо развивать устойчивые

альтернативы для существующей в данный момент системы организации сельского хозяйства с целью уменьшения негативного воздействия на окружающую среду. Таким образом, актуальность представленной работы по изучению адаптивных реакций растений в ответ на низкодозовое облучение определяется необходимостью минимизировать последствия одновременного действия климатических изменений и факторов антропогенной природы на дикорастущие и культурные растения. В качестве стрессового фактора в данной работе рассматривается действие ионизирующего излучения в низких (не вызывающих выраженного фенотипического эффекта) дозах.

Степень разработанности проблемы. Сведения об экологических и эволюционных последствиях хронического облучения популяций растений в дозах, встречающихся в современной биосфере, необходимы для обоснования новых принципов экологического нормирования (Bréchignac et al., 2016), разрабатываемых в настоящее время рядом международных организаций (МКРЗ, МСР, МАГАТЭ). Чернобыльская авария обусловила крупномасштабное и гетерогенное радиоактивное загрязнение обширных территорий. Показано, что организмы в их естественной среде обитания более чувствительны к радиационному воздействию, чем в лабораторных условиях, причём различия в чувствительности практически достигают одного порядка величины (Garnier-Laplace et al., 2013). При этом Международное агентство по атомной энергии (МАГАТЭ) отмечает, что дозы хронического облучения, не превышающие 400 мкГр/ч (10 мГр/день), будут оказывать слабый эффект даже на радиочувствительные растения, а возникновение значимых негативных эффектов у более широкого диапазона видов, населяющих природные растительные сообщества, маловероятно (Linsley, 1997). Однако подобные выводы основаны на экспертных оценках и не подкреплены серьёзными полевыми исследованиями, что особенно важно в контексте повышенной радиочувствительности природных популяций по сравнению с лабораторными растениями.

Ионизирующее излучение может оказывать стимулирующее действие на рост и развитие растений при применении его в низких дозах (Гудков и др., 1991; Jan et al., 2012; Araújo et al., 2016). Фенотипические проявления такого рода можно рассматривать в

качестве адаптивной реакции растений в ответ на стрессовое воздействие низкой интенсивности. Молекулярная основа таких изменений и её взаимосвязь со стимуляцией роста и развития растений в настоящее время изучены слабо. Стимуляция роста растений в ответ на облучение семян в низких дозах, по-видимому, связана с индукцией общего адаптивного ответа организма на стрессовые условия (Pollycove, Feinendegen, 2001; Stark, 2008; Mattson, Calabrese, 2010). Несмотря на то, что использование технологии предпосевного облучения семян для увеличения урожая может быть затруднено в реальной агрономической практике в связи с нестабильностью стимулирующего эффекта в полевых условиях, выявление молекулярных путей, вовлечённых в стимуляцию роста проростков облучённых семян, позволит повысить эффективность будущих исследований по созданию высокоурожайных и стрессоустойчивых сортов сельскохозяйственных культур и внесёт вклад в расшифровку адаптивных реакций растений на слабые стрессовые воздействия.

Цель диссертационной работы: выявление адаптивных реакций растений на разных уровнях биологической организации после облучения низкими дозами ионизирующего излучения.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Проанализированы темпы мутагенеза и изменения генетической структуры в популяциях *Pinus sylvestris*, подвергающихся хроническому облучению на территориях, загрязнённых радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС.
2. Исследованы ферментный и неферментный компоненты антиоксидантной системы и степень окислительного стресса в хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris*.
3. Изучены эпигенетические процессы и активность мобильных генетических элементов в хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris*.
4. Определён профиль экспрессии генов, характерный для хвои хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*.
5. Проанализировано возникновение однонуклеотидных полиморфизмов в ДНК хвои хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris* и выполнена их функциональная аннотация.

6. Оценены биохимические изменения в проростках семян *Hordeum vulgare*, облучённых низкими дозами γ -излучения в контролируемых условиях.
7. Исследован профиль экспрессии генов, характерный для зародышей γ -облучённых семян *H. vulgare*, и его взаимосвязь с радиационно-индуцированными морфологическими изменениями в проростках.
8. Проанализирован метаболом проростков γ -облучённых семян *H. vulgare* и выявлены особенности метаболического профиля в разных тканях растений.
9. Сформулированы общие закономерности адаптивных реакций растений на воздействие низких доз острого и хронического облучения.

Научная новизна. Научная новизна работы заключается в анализе широкого спектра радиobiологических эффектов, возникающих в облучённых растениях под действием низких нелетальных доз ионизирующего излучения. С использованием как изоферментных, так и ДНК-маркеров были впервые выявлены изменения генетической структуры популяций *P. sylvestris*, подвергающихся хроническому низкодозовому облучению с годовой мощностью дозы, считающейся безопасной для наземных экосистем (не превышающей 100 мГр/год). В экспериментальных популяциях *P. sylvestris* впервые обнаружены изменения концентраций компонентов антиоксидантной системы и признаки окислительного стресса. Впервые при относительно низких мощностях доз выявлены эпигенетические эффекты, заключающиеся в гиперметилировании генома хронически облучаемых деревьев и в контроле активности мобильных генетических элементов. Впервые методом высокопроизводительного секвенирования РНК проведён транскриптомный анализ тканей хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris* и обнаружено, что адаптивные реакции на хроническое облучение включают в себя модуляцию концентраций активных форм кислорода (АФК), контроль клеточных повреждений за счёт усиления экспрессии гистонов и белков теплового шока и модуляцию ионного баланса. Впервые функционально аннотированы вновь возникшие однонуклеотидные полиморфизмы в геномах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*. Впервые проведён комплексный биохимический анализ проростков семян *H. vulgare*, облучённых различными дозами γ -излучения, и выявлены повышенные

концентрации АФК в органах проростков даже через несколько дней после облучения. Впервые обнаружено, что низкие и высокие дозы облучения семян *H. vulgare* приводят к контрастным профилям экспрессии генов зародышей, которые функционально соответствуют обнаруженным фенотипическим изменениям проростков, выросших из облучённых семян. Впервые проанализирован метаболический профиль проростков облучённых семян ячменя и показано перераспределение доступного растениям азота и изменения концентраций стрессовых метаболитов. Впервые сформулированы общие закономерности формирования адаптивных реакций растений на низкие дозы ионизирующего излучения, включающие в себя синтез шаперонов и шапероноподобных белков, ответ системы фотосинтеза, контроль уровней АФК.

Теоретическая и практическая значимость. Обобщение экспериментальных результатов, представленных в настоящей работе, вносит важный вклад в решение фундаментальной проблемы действия низких доз ионизирующего излучения на живые организмы, обосновывая общие молекулярные и биохимические закономерности адаптивных реакций растений на действие острого и хронического низкодозового облучения. Полученные результаты создают научную основу для обоснования новых принципов экологического нормирования, разрабатываемых в настоящее время рядом международных организаций (МКРЗ, МСР, МАГАТЭ). Научные данные о последствиях облучения растений в контролируемых и природных условиях необходимы для обеспечения населения актуальной научной информацией в целях борьбы с распространением радиофобии, препятствующей усилиям по внедрению радиационных технологий и атомной энергетики в экономику РФ. Выявленные в рамках исследования кандидатные гены и метаболиты, связанные с формированием эффекта радиационной стимуляции, могут быть использованы в биотехнологии растений для получения стрессоустойчивых и продуктивных сортов сельскохозяйственных культур. Результаты работы соискателя включены в учебный процесс ИАТЭ НИЯУ МИФИ (дисциплины «Радиационная генетика», «Биологическая химия»).

Методология и методы исследования. В основу методологии исследований положен принцип «от частного к общему», применение которого позволило

сформулировать общее представление об адаптивных реакциях растений в ответ на облучение исходя из решения отдельных экспериментальных задач. Решение поставленных задач выполнено с использованием современных аналитических методов. В качестве объектов исследования в данной работе выбраны хозяйственno ценный вид деревьев сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* и важная сельскохозяйственная культура ячмень обыкновенный *Hordeum vulgare*. Для оценки активности радионуклидов в пробах почвы и шишек на экспериментальных участках использовали γ -спектрометрический метод и радиохимический анализ. Поглощённую дозу в органах *P. sylvestris* оценивали с помощью дозиметрической модели. Поглощённую дозу при остром γ -облучении семян *H. vulgare* оценивали с помощью дозиметра ДКС-101. Основные физико-химические характеристики почвы определяли в соответствии со стандартом ISO 17025. Оценку концентраций тяжёлых металлов в почвах экспериментальных участков выполняли спектрофотометрическим методом с индуктивно-связанной плазмой. Изоферментный полиморфизм был изучен с применением метода вертикального электрофореза в полиакриламидном геле и гистохимического окрашивания зимограмм. AFLP-анализ был проведён с применением метода ПЦР и капиллярного электрофореза, обработка данных была проведена с применением широкого спектра программных средств и статистических подходов. Активность ферментов оценивали с применением метода спектрофотометрии. Анализ концентраций малонового диальдегида, низкомолекулярных антиоксидантов, фитогормонов в тканях растений был проведён методом высокоэффективной обращённо-фазовой жидкостной хроматографии. Оценку полногеномного метилирования цитозина выполняли с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Концентрации пероксида водорода оценили с применением флуориметрии. Данные, полученные в экспериментах, обрабатывали методами параметрической и непараметрической статистики в зависимости от вида распределения данных. Транскриптомные анализы выполняли при помощи технологии ДНК-микрочипов и высокопроизводительного секвенирования РНК. Анализ метаболома провели с использованием газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Контроль качества, обработку и анализ полученных данных проводили с использованием современных подходов биоинформатики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Общие закономерности адаптивного ответа растений на низкие дозы как острого, так и хронического облучения включают в себя синтез шаперонов и шапероноподобных белков, ответ системы фотосинтеза, фитогормональные изменения и контроль уровней АФК.
2. Хроническое низкодозовое облучение в зоне аварии на Чернобыльской АЭС приводит к увеличению уровня мутагенеза, изменениям генетической структуры популяций *P. sylvestris* и гиперметилированию геномов облучённых деревьев.
3. Адаптивные реакции в популяциях *P. sylvestris* на хроническое низкодозовое облучение включают модуляцию баланса АФК, контроль ионного гомеостаза и усиление экспрессии генов, кодирующих гистоны и белки теплового шока.
4. Облучение семян *H. vulgare* низкими дозами γ -излучения приводит к повышению активности ферментов, изменению соотношения фитогормонов и накоплению пероксида водорода в проростках облучённых семян, что создаёт предпосылки для стимуляции роста проростков.
5. Облучение семян *H. vulgare* в широком диапазоне доз обуславливает контрастные профили экспрессии генов зародышей, при этом облучение низкими дозами вызывает сдвиг в скорости прохождения онтогенетических фаз при прорастании семян, связанный с более эффективной мобилизацией белков и метаболитов, фитогормональным сигналингом и модуляцией уровней АФК в клетках облучённых растений.
6. Метаболические профили проростков семян *H. vulgare*, облучённых низкими дозами γ -излучения, свидетельствуют о перераспределении доступного азота в тканях облучённых растений и подчёркивают важную роль катаболизма аскорбиновой кислоты в формировании эффекта радиационной стимуляции.

Достоверность результатов. Достоверность результатов определяется применением современных аналитических методов анализа на сертифицированном оборудовании, использованием биологических и технических повторностей при

проведении экспериментов для оценки воспроизводимости результатов, объёмами выборок и адекватным использованием параметрических и непараметрических методов статистического анализа, а также современных подходов биоинформатики.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 03.01.01 «Радиобиология», охватывающей такие области исследований как молекулярно-клеточные и биохимические механизмы лучевого поражения (п. 3), последствия ядерных катастроф и радиоэкология (п. 9), принципы и методы радиационного мониторинга (п. 10) и отдалённые последствия действия излучений, хроническое действие радиации, особенности биологического действия малых доз облучения (п. 11), с формулой специальности 03.02.07 «Генетика», охватывающей такие области исследований как мутационная изменчивость, радиационный и химический мутагенез (п. 4), эпигенетика (п. 6), структурная, функциональная и эволюционная геномика, генетическая биоинформатика. (п. 12), популяционная генетика, генетическая структура популяций (п. 14) в диссертации представлены обобщённые результаты комплексного анализа действия острого и хронического низкодозового облучения на растения на разных уровнях биологической организации.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 100 печатных работ, 18 из них статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты работы были доложены и обсуждены на 35-ти всероссийских и международных конференциях, включая 3rd SETAC CEE Annual Meeting (Краков, Польша, 2012), 3rd International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (Барселона, Испания, 2014), Plant Biology-2015 (Миннеаполис, США), 4th International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (Берлин, 2017), International Plant Molecular Biology (Монпелье, Франция, 2018); 5th International Scientific Conference «Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology» (Новосибирск, 2019).

Личный вклад диссертанта в работу. Автор принимала непосредственное участие в формулировке целей и задач диссертационной работы, в планировании и проведении экспериментов. Автором самостоятельно выполнена часть электрофоретических, спектрофотометрических, флуориметрических,

хроматографических, высокопроизводительных (транскриптомика и метаболомика) анализов, проведена статистическая обработка всех экспериментальных данных, представленных в диссертации. Автор планировала, методологически поддерживала и участвовала в выполнении всех экспериментальных работ, представленных в диссертации. Автор непосредственно участвовала в подготовке публикаций, в формулировке основных положений работы и выводов. Экспериментальные данные, представленные в диссертации, получены лично соискательницей или в соавторстве с сотрудниками ФГБНУ ВНИИРАЭ, работавшими совместно с автором в процессе выполнения исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа состоит из введения, 10-ти глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, включающего 538 источников, из них 479 на иностранном языке, и 7-ми приложений. Диссертация изложена на 390 страницах, содержит 29 таблиц и 27 рисунков.

Глава 1. ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РАСТЕНИЯ

В Главе 1 ионизирующее излучение рассмотрено в качестве стрессового фактора, оказывающего как прямое, так и косвенное повреждающее действие на растения. Отмечена необходимость учитывать принципиально разный характер формирования радиобиологических эффектов при действии высоких и низких доз излучения, а также тот факт, что ответ растения на острое радиационное воздействие может быть неспецифическим и серьёзно отличаться от стрессового ответа на хроническое облучение. Обсуждена роль активных форм кислорода во внутриклеточной передаче сигнала и отмечено, что АФК и сопряжённые с ними сигнальные пути могут играть ключевую роль в развитии адаптивных реакций растений в ответ на облучение в низких дозах. Изучение подобных реакций на разных уровнях организации растений позволяет получить целостную картину развития радиобиологического эффекта от генотипа к фенотипу. Анализ современных литературных источников показал, что подходы, используемые в системной биологии, могут помочь в анализе сложных многокомпонентных

взаимодействий, опосредующих адаптивные реакции растений на низкие дозы ионизирующего излучения.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В Главе 2 приведены методические детали экспериментов, результаты которых представлены в диссертационной работе. Рассмотрены объекты исследования: сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L. и ячмень обыкновенный *Hordeum vulgare* L. Приведено описание экспериментальных участков в зоне аварии на Чернобыльской АЭС и методы оценок почвенных характеристик и особенностей радиоактивного загрязнения. Описаны особенности острого облучения и проращивания семян *H. vulgare*. Детально рассмотрены использованные методы анализа изоферментного полиморфизма, полиморфизма длины амплифицированных фрагментов, содержания низкомолекулярных антиоксидантов и малонового диальдегида, активности ферментов, концентраций фитогормонов, уровня полногеномного метилирования, содержания пероксида водорода. Приведены детали биоинформационической обработки данных секвенирования РНК, анализа ДНК-микрочипов, анализа метаболома.

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УЧАСТКОВ В ЗОНЕ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АВАРИИ

Экспериментальные участки для изучения эффектов хронического радиационного воздействия в популяциях *P. sylvestris* расположены на территориях, загрязнённых радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Наибольшие уровни загрязнения на территории Российской Федерации наблюдаются в Брянской области, где были выбраны четыре экспериментальных участка: Всероссийский научно-исследовательский институт удобрений и агропочвоведения (**ВИУА**), Старые Бобовичи (**СБ**), Зaborье Поле (**ЗП**) и Зaborье Кладбище (**ЗК**). Ещё три экспериментальных участка находятся на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (**ПГРЭЗ**) в Гомельской области Республики Беларусь – Масаны (**Мас**), Кулажин (**Кул**), Кожушки (**Кож**). В качестве контрольных выбрали два незагрязнённых

участка Брянской области с фоновым уровнем радиоактивного загрязнения (Контроль (K), Контроль 1 (K1)).

3.1 Химические свойства почв экспериментальных участков. Параметры почв в целом типичны для Центрального региона Российской Федерации и для Республики Беларусь.

3.2 Загрязнение почв экспериментальных участков тяжёлыми металлами. Концентрации тяжёлых металлов Cd, Cu, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn в почвах экспериментальных участков не превышали соответствующие ориентировочно и максимально допустимые концентрации в почвах, принятые в Российской Федерации и в Республике Беларусь (Гигиенические нормативы, 2004; Гигиенические стандарты, 2006).

3.3 Содержание радионуклидов в почве и биологическом материале. На экспериментальных участках удельная активность ^{137}Cs в почве и шишках *P. sylvestris* варьирует, достигая максимальных значений на участках Гомельской области. Концентрации ^{90}Sr и ^{137}Cs в шишках на радиоактивно загрязнённых участках значительно выше, чем в фоновых условиях. Для учёта поглощённой дозы, формируемой α -излучающими радионуклидами, были использованы данные по плотности загрязнения из (Атлас, 2009). Медианную оценку и межквартильный размах удельной активности радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr в почве и шишках на экспериментальных участках, оценённой в разные годы пробоотбора, использовали для расчёта мощности поглощённой дозы.

3.4 Оценка годовых поглощённых доз в кронах *P. sylvestris*. Для оценки поглощённых в кроне деревьев доз была использована дозиметрическая модель (Спиридонов и др., 2008). Результаты расчёта мощности поглощённой дозы, формируемой γ - и β -излучением в 2008-2016 гг., с учётом вклада $^{238-241}\text{Pu}$ и ^{241}Am в поглощённую дозу, а также суммарная мощность дозы, формируемая γ -, β - и α -излучениями, приведены в Таблице 1. Основной вклад в формирование поглощённой дозы практически на всех исследуемых участках вносил ^{137}Cs , содержащийся в верхнем почвенном слое.

Таблица 1 – Годовые поглощённые дозы облучения для деревьев *P. sylvestris* на экспериментальных участках (2008-2016 гг.).

Участок	D _γ , мГр			D _β , мГр			D _α , мГр			D _{sum} , мГр		
	Q1	M	Q3	Q1	M	Q3	Q1	M	Q3	Q1	M	Q3
К	0.022	0.025	0.031	0.002	0.004	0.006	–	–	–	0.02	0.03	0.04
К1	0.025	0.039	0.160	0.005	0.006	0.008	–	–	–	0.03	0.05	0.17
ВИУА	4.8	11.2	18.1	0.14	0.18	0.30	–	–	–	4.9	11.4	18.4
СБ	9.5	13.6	21.6	0.10	0.15	0.17	–	–	–	9.6	13.8	21.8
ЗП	28.7	36.3	43.7	0.76	1.00	1.19	–	–	–	29.5	37.3	44.9
ЗК	31.9	38.2	49.5	0.41	0.45	0.56	–	–	–	32.3	38.7	50.1
Кож	3.6	14.2	24.9	0.93	7.55	14.2	0.16	0.46	0.75	4.7	22.2	39.9
Кул	35.2	49.3	63.3	2.23	3.11	4.00	8.37	13.17	17.97	45.8	65.6	85.3
Мас	28.4	35.7	42.9	5.01	9.24	13.5	26.27	33.71	41.14	59.7	78.6	97.5

Примечание: Q1 – первый quartиль; M – медианное значение; Q3 – третий quartиль.

Глава 4. МУТАГЕНЕЗ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ

***P. SYLVESTRIS* ИЗ ЗОНЫ АВАРИИ НА ЧАЭС**

Экспериментальные наблюдения за растениями, произрастающими в условиях хронического облучения, предоставляют уникальную возможность для изучения начальных этапов генетической дифференциации популяций в стрессовых условиях.

4.1 Анализ изоферментного полиморфизма метаболических и антиоксидантных ферментов. Анализ изоферментного полиморфизма в группах антиоксидантных (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) и метаболических (лейцинаминопептидаза, малатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) ферментов выявил повышенную частоту мутаций в эндоспермах семян хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris* в Брянской области (Таблица 2). Частота мутаций коррелировала с уровнями радиационного воздействия, зарегистрированными на экспериментальных участках ($r_s = 0.99$, $p = 0.001$).

Таблица 2 – Частоты разных типов мутаций в изоферментных локусах эндоспермов хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*.

Участок	Число локус-тестов	Частота нуль-мутаций	Частота дупликаций	Частота ИЭП	Общая частота мутаций
К	2457	0.002 ± 0.001	0	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.001
К1	999	0.003 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.002	0.008 ± 0.002
ВИУА	2459	0.005 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.009 ± 0.002 **

Продолжение Таблицы 2

СБ	2313	0.011± 0.002 ***▲	0.004 ± 0.001 ***	0.004 ± 0.001 * 0.001	0.020 ± 0.004 ***▲▲
ЗП	2589	0.024 ± 0.003 ***▲▲▲	0.007 ± 0.002 ***▲	0.007 ± 0.002 *** 0.002	0.041 ± 0.004 ***▲▲▲
ЗК	2228	0.029 ± 0.004 ***▲▲▲	0.011 ± 0.002 ***▲▲▲	0.010 ± 0.002 ***▲▲ 0.002	0.054 ± 0.005 ***▲▲▲

Примечание: значимые различия с участком К: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$. Значимые различия с участком К1: ▲ – $p < 0.05$; ▲▲ – $p < 0.01$; ▲▲▲ – $p < 0.001$ (t-критерий Стьюдента). ИЭП – изменения электрофоретической подвижности.

Выявлено, что генотипическое разнообразие антиоксидантных ферментов значимо повышено на наиболее загрязнённых участках Брянской области ЗК и ЗП, в целом возрастая вместе с уровнем поглощённой дозы ($r_s = 0.90$, $p = 0.037$). При этом индекс генотипического разнообразия метаболических ферментов не зависел от радиационного воздействия ($r_s = 0.26$, $p = 0.623$). Эффективное число аллелей для антиоксидантных ферментов также сильнее коррелировало с мощностью поглощённой дозы ($r_s = 0.90$, $p = 0.034$), чем тот же показатель для метаболических ферментов ($r_s = 0.83$, $p = 0.042$). Основываясь на данных о наличии и частотах встречаемости аллелей в популяции, были проанализированы генетические расстояния между экспериментальными популяциями. Кластерный анализ выделил две группы, первая из которых включала популяции, произрастающие на сильнозагрязнённых территориях Брянской области (ЗК и ЗП), а вторая включала менее загрязнённые (ВИУА и СБ) и контрольные (К и К1) участки (Volkova et al., 2017).

4.2 Исследование генетической структуры методом полиморфизма длины амплифицированных фрагментов. Изучение AFLP-локусов в экспериментальных

популяциях *P. sylvestris* показало, что индекс генетического разнообразия Нея значимо коррелировал с уровнем годовой поглощённой дозы ($r_s = 0.79$, $p = 0.021$, Volkova et al., 2018). Дендрограмма, построенная на основе генетических расстояний Нея, разделяет популяции не только по географическому положению, но и по уровню радиационного воздействия (Рисунок 1). Исследования, выполненные на тех же участках в Брянской области с использованием биохимических маркеров (Раздел 4.1), свидетельствуют о том, что увеличение генетического разнообразия в облучаемых популяциях, выявленное при использовании ДНК-маркеров, может быть связано с радиоактивным загрязнением, что подтверждается пространственным подразделением популяций внутри географических кластеров (Рисунок 1).

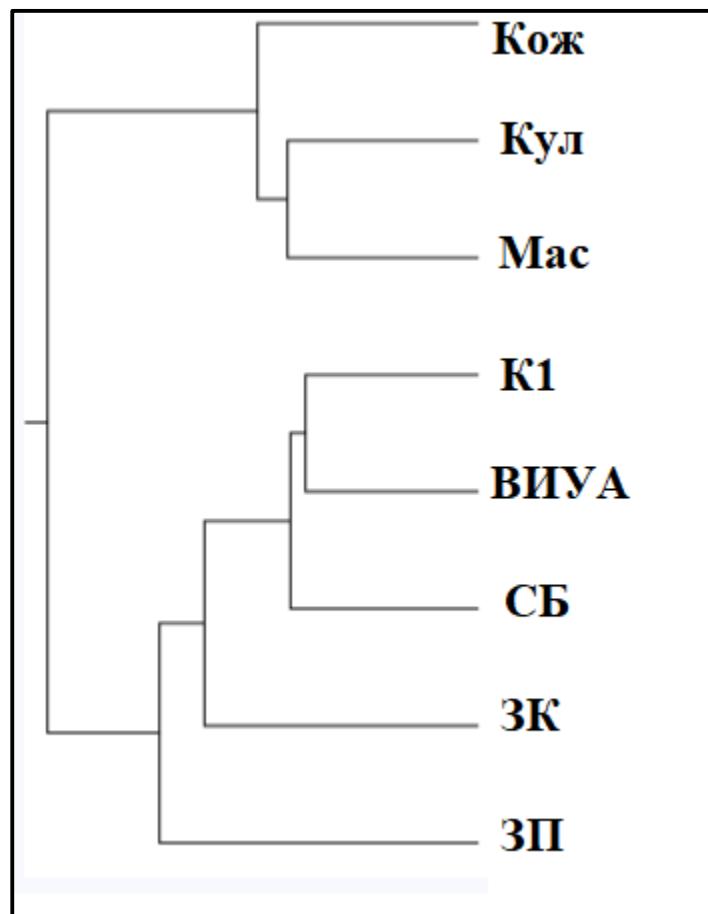


Рисунок 1. Дендрограмма, показывающая соподчинённость популяций на основе присутствия или отсутствия AFLP-фрагментов и генетических расстояний Нея

Изучение генетической структуры популяций *P. sylvestris*, произрастающих на территориях, загрязнённых радионуклидами, показало разную чувствительность молекулярных маркеров к хроническому облучению. В локусах, кодирующих изоферменты, была обнаружена повышенная частота мутаций, а показатели генетического разнообразия, оценённые при помощи функционально значимых биохимических маркеров, возрастили на радиоактивно загрязнённых территориях. При помощи ДНК-маркеров не удалось выявить значимых изменений частоты мутаций в AFLP-локусах, однако возрастание среднего генетического разнообразия Нея также указывает на то, что в среднесрочной перспективе хроническое низкодозовое облучение может обусловить изменения в генетической структуре популяций *P. sylvestris*.

Глава 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА *P. SYLVESTRIS* НА ХРОНИЧЕСКОЕ ОБЛУЧЕНИЕ

5.1 Анализ активности ферментов в эндоспермах семян. Активность ферментов в эндоспермах *P. sylvestris* анализировали для оценки влияния выявленных генетических вариаций на фенотип. Дозозависимые изменения активности ферментов были обнаружены только для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы G6PDH ($r_s = 0.89$, $p = 0.019$, Волкова и др., 2016). Активность остальных изученных ферментов (глутатионпероксидазы GPx, супероксиддисмутазы SOD, каталазы CAT, малатдегидрогеназы MDH и лейцинаминопептидазы LAP) не зависела от поглощённой дозы ($r_s = -0.80-0.10$, $p = 0.104-0.872$). Таким образом, мощности доз в Брянской области недостаточны для индукции значимых изменений ферментной активности в эндоспермах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris* (Volkova et al., 2017).

5.2 Анализ концентраций низкомолекулярных антиоксидантов и малонового диальдегида в хвое. Концентрации низкомолекулярных антиоксидантов (Таблица 3) не зависели от уровня радиационного воздействия ($r_s =$

0.48, $p = 0.187$ для восстановленного глутатиона GSH; $r_s = -0.25$, $p = 0.516$ для окисленного глутатиона GSSG; $r_s = -0.13$, $p = 0.732$ для аскорбиновой кислоты AsA). Однако на наиболее загрязнённых участках росло соотношение GSH/GSSG. Изменение отношения GSH/GSSG в процессе элиминации H_2O_2 связано с путями сигналинга АФК (Pastori, Foyer, 2002). Повышение соотношения GSH/GSSG на наиболее загрязнённых участках можно рассматривать в качестве адаптивной реакции в ответ на хроническое облучение. Концентрации маркера окислительного стресса малонового диальдегида (МДА) в экспериментальных популяциях в целом повышены, в особенности в сильно загрязнённой популяции Кул (Таблица 3). Результаты анализа свидетельствуют об ответе антиоксидантной системы на облучение в наиболее радиоактивно загрязнённых популяциях *P. sylvestris*, а увеличение концентрации МДА указывает на снижение целостности мембран и активацию перекисного окисления липидов в клетках растений (Volkova et al., 2017).

Глава 6. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И КОНТРОЛЬ АКТИВНОСТИ ТРАНСПОЗОНОВ В ГЕНОМАХ ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧАЕМЫХ ДЕРЕВЬЕВ

P. SYLVESTRIS

6.1 Оценка уровня метилирования генома *P. sylvestris* в образцах хвои.

Добавление метильной группы в положение С5 цитозинового кольца (CpG-метилирование ДНК) является наиболее распространённой эпигенетической модификацией в ДНК растений и представляет собой стратегию стабилизации генома (Flores et al., 2013). Геномы деревьев *P. sylvestris*, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях, были значимо гиперметилированы по сравнению с контрольным участком (Рисунок 2), при этом корреляции уровня метилирования с поглощённой дозой не было ($r_s = 0.05$, $p = 0.910$). Это свидетельствует о том, что эпигенетические процессы не зависят от дозы в подверженных радиационному воздействию популяциях в исследованном диапазоне доз.

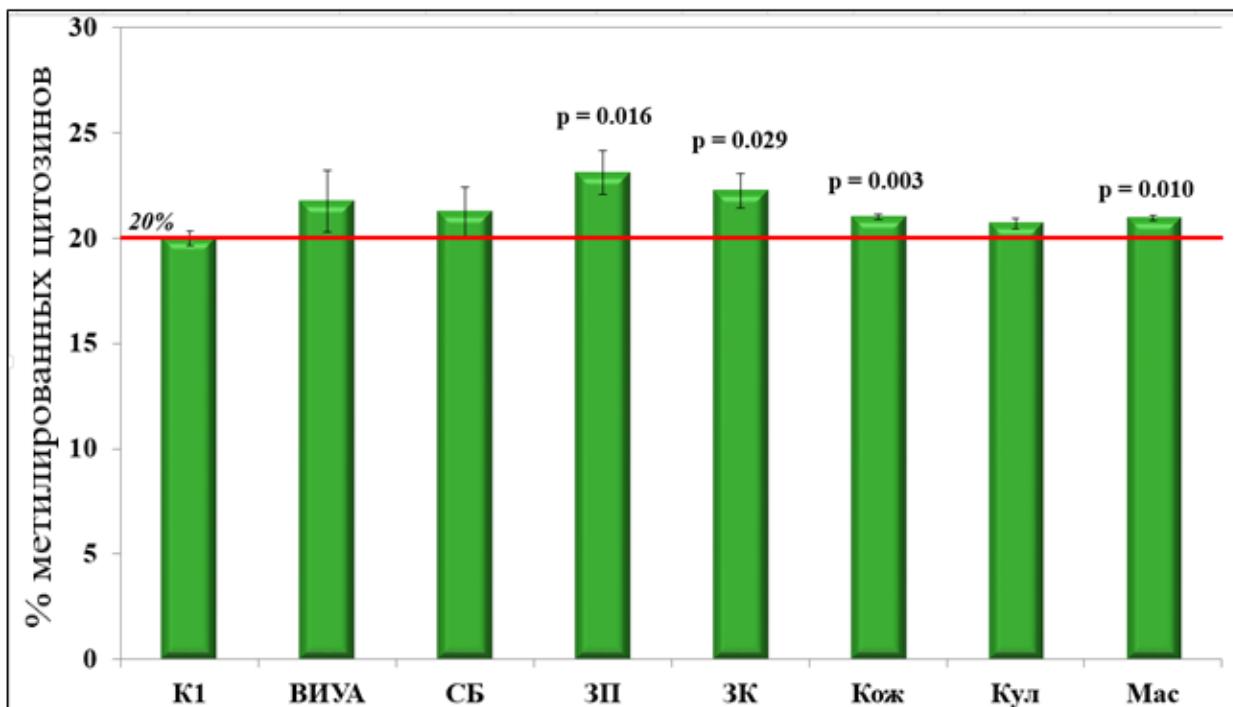
Таблица 3 – Концентрации низкомолекулярных антиоксидантов и малонового диальдегида в хвое хронически облучаемых хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*

Участок	Доза, мГр/год	Концентрации, мМ/мл								
		GSH			GSSG			GSH/GSSG		
		Q1	M	Q3	Q1	M	Q3	Q1	M	Q3
K	0.03	0.025	0.033	0.039	0.014	0.020	0.023	1.013	1.581	3.090
K1	0.05	0.020	0.030	0.044	0.018	0.027	0.037	0.792	0.851	1.286
ВИУ А	11.4	0.025	0.027	0.065	0.015	0.020	0.031	1.255	1.441	1.828
СБ	13.8	0.061	0.074 (p = 0.035, K; 0.008, K1)	0.120	0.017	0.021	0.031	2.609	4.111 (p = 0.0008, K1)	4.660
ЗП	37.3	0.025	0.034	0.043	0.021	0.022	0.024	1.133	1.319	1.722
ЗК	38.7	0.039	0.054	0.058	0.024	0.031 (p = 0.037, K)	0.034	1.588	1.664 (p = 0.034, K1)	2.077
Кож	22.2	0.012	0.021	0.033	0.016	0.022	0.031	0.613	0.816	1.471
Кул	65.6	0.059	0.070 (p = 0.010, K1)	0.107	0.010	0.017 (p = 0.037, K1)	0.019	3.314	4.887 (p = 0.049, K; 0.001, K1)	8.432
Mac	78.6	0.036	0.048	0.086	0.009	0.014 (p = 0.029, K1)	0.018	1.951	4.406 (p = 0.002, K1)	5.326

Продолжение Таблицы 3

Участок	Доза, мГр/ год	Концентрации, мМ/мл					
		AsA			MDA		
		Q1	M	Q3	Q1	M	Q3
K	0.03	0.080	0.104	0.187	1.286	1.413	4.656
K1	0.05	0.100	0.141	0.154	0.524	1.341	1.867
ВИУА	11.4	0.118	0.140	0.147	1.144	1.528	2.853
СБ	13.8	0.122	0.145	0.175	2.008	2.692	3.382
ЗП	37.3	0.112	0.124	0.139	0.406	2.435	4.015
ЗК	38.7	0.117	0.144	0.171	0.569	1.408	1.778
Кож	22.2	0.068	0.080 (p = 0.006, K1)	0.103	0.810	1.128	1.308
Кул	65.6	0.096	0.100	0.125	2.452	3.431 (p = 0.001, K1)	5.703
Мас	78.6	0.112	0.131	0.144	1.482	1.788	2.496

Примечание: M – медиана; Q1 – первый квартиль; Q3 – третий квартиль. В скобках приведены уровни значимости p < 0.05 (U-критерий Манна-Уитни).

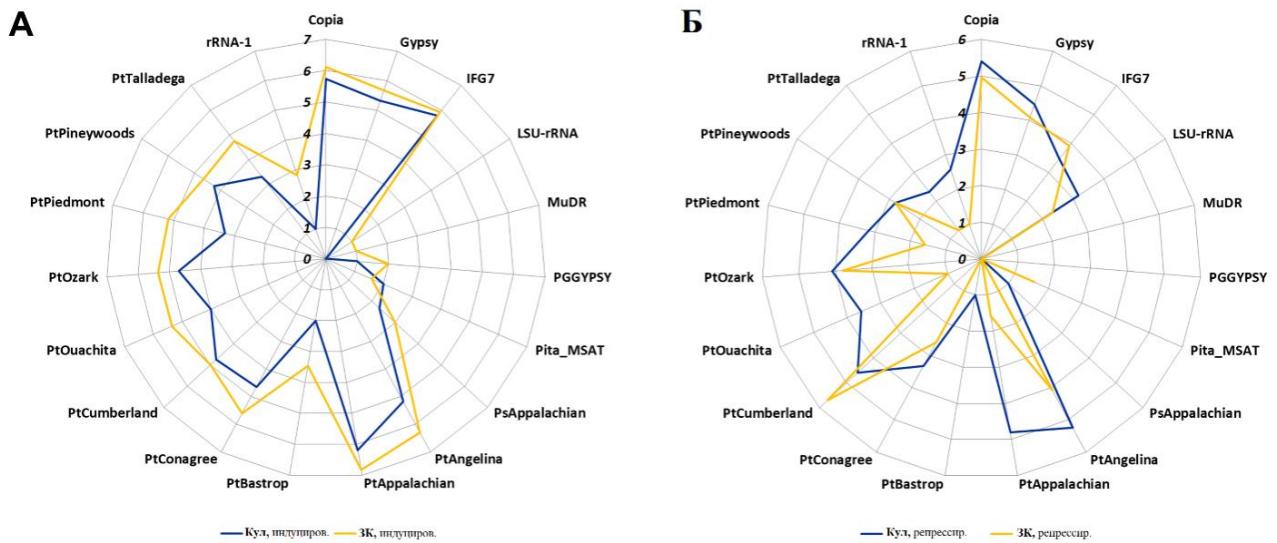


На рисунке приведены средние значения, стандартные ошибки и уровни значимости $p < 0.05$ (t-критерий Стьюдента).

Рисунок 2. Полногеномное метилирование в образцах хвои *P. sylvestris* из радиоактивно загрязнённых популяций. Красной линией отмечен контрольный уровень метилирования.

6.2 Изучение активности транспозонов в геномах хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris*. Наблюдаемые особенности метилирования геномов хронически облучаемых деревьев *P. sylvestris* могут быть связаны с контролем активности мобильных генетических элементов. Известно, что до 80% генома видов рода *Pinus* состоит из последовательностей транспозонов (Kovach et al., 2010); для генома *P. sylvestris* примерные оценки составляют 70-75% (Kole, 2007; Voronova et al., 2011). Метилирование последовательностей транспозонов является известным способом контроля их активности (Ikeda, Nishimura, 2015). Учитывая повышенный уровень метилирования генома в популяциях сосны (Рисунок 2, Volkova et al., 2018), было выдвинуто предположение, что большая часть радиационно-индукционного гиперметилирования в геноме *P. sylvestris* может быть связана с контролем активности транспозонов, индуцируемой хроническим радиационным воздействием.

Секвенирование РНК и последующий биоинформатический анализ данных позволили выявить в популяциях **K1**, Кул и ЗК, исследованных в эксперименте, 991 уникальный континг, совпадающий с последовательностями транспозонов. Семейства транспозонов *Copia*, *Gypsy*, *IFG7*, *PtAngelina*, *PtAppalachian* и *PtCumberland* имели наибольшее число активных элементов, (Рисунок 3, Duarte et al., 2019).



А – число транспозонов, индуцированных радиационным воздействием. **Б** – число транспозонов, подавленных радиационным воздействием. Жёлтая линия – участок **ЗК**. Синяя линия – участок **Кул**. Число транспозонов представлено в логарифмической шкале.

Рисунок 3. Относительная активность транспозонов наиболее представленных семейств по сравнению с участком **K1** на сильно- (**Кул**) и слабозагрязнённом (**ЗК**) экспериментальных участках.

Приведённые данные свидетельствуют о том, что хроническое облучение изменяет активность транспозонов в популяциях **Кул** и **ЗК**, однако эти изменения разнонаправлены. Слабозагрязнённый участок **ЗК** характеризовался большим числом элементов с индуцированной активностью, чем сильнозагрязнённый **Кул** (Рисунок 3, А). При этом большее число репрессированных транспозонов было обнаружено в популяции **Кул** по сравнению с популяцией **ЗК** (Рисунок 3, Б). Полученные результаты позволяют выдвинуть две гипотезы. Во-первых, по-видимому, для изменений контроля активности транспозонов необходим определённый дозовый порог, что согласуется с данными по гиперметилированию генома, обсуждёнными в предыдущем разделе. Во-вторых, радионуклидный состав

загрязнения может играть роль в контроле активности транспозонов, принимая во внимание тот факт, что популяция ЗК главным образом подвержена γ -облучению, а Кул также характеризуется высокими уровнями как внешнего γ -, так и внутреннего α - и β -облучения исследуемых растений (Таблица 1).

Глава 7. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧАЕМЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *P. SYLVESTRIS*

7.1 Сборка транскриптома *de novo* и кластерный анализ. Было проведено секвенирование РНК хвои хронически облучаемых деревьев на экспериментальных участках ЗК (Брянская область), Кул и Mac (Гомельская область), и K1 (контрольный участок в Брянской области). Собранный *de novo* транскриптом *P. sylvestris* был представлен 98870 уникальными транскриптами, 76.5% из которых были успешно аннотированы. В работе приведены гомологи белков, кодируемых обнаруженными в эксперименте транскриптами, из базы данных UniProt.

7.2 Дифференциальная экспрессия генов в хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris*. Сравнение популяций Mac, Кул и ЗК с контрольной популяцией K1 выявило 225, 278 и 69 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), соответственно ($p < 0.001$; $\log_2 FC > |1|$, Duarte et al., 2019). Несколько генов характеризовались односторонними изменениями экспрессии на всех радиоактивно загрязнённых участках (пять с пониженной экспрессией и два с повышенной, Таблица 4). Наиболее загрязнённые участки Mac и Кул характеризовались наибольшим числом общих дифференциально экспрессирующихся элементов. Из семи общих для трёх участков транскриптов четыре связаны с ответом на стресс: транскрипт анионной пероксидазы, связанной с апоптозом, и три транскрипта, связанные с АБК-сигналингом (*CIPKK_ARATH*, *CIPKA_ARATH* и *SLAC1_ARATH*) (Таблица 4).

Таблица 4 – Транскрипты, общие для всех радиоактивно загрязнённых участков.

UniProt ID	Функция	Описание	$\log_2 FC$		
			Mac	Кул	ЗК
WUN1_SOLTU	Апоптоз	Белок, индуцируемый ранением 1	2.8	2.4	1.8

Продолжение Таблицы 4

HY5_SOLLC	Фотоморфорегулятор независимый от света	Транскрипционный фактор HY5	2.2	1.7	1.1
CIPK5_ORYSJ	Передача сигнала абсцизовой кислоты	CBL-взаимодействующая протеинкиназа 20	-1.3	-2.3	-1.3
CIPK1_ORYSJ		CBL-взаимодействующая протеинкиназа 10	-3.2	-4.7	-1.9
SLAC1_ARATH	Закрытие устьиц	Анионный канал замыкающих клеток устьиц S-типа SLAC1	-1.6	-2.0	-1.7
P2B11_ARATH	Убиквитинирование белка	Белок с F-box доменом PP2-B11	-4.0	-4.2	-3.1
-	Неизвестный белок	-	-2.0	-2.3	-1.5

Примечание: значения экспрессии генов выражены в \log_2 Fold Change по сравнению с популяцией K1.

Согласно литературным данным, среди генов, представленных в Таблице 4, только ген анионного канала S-типа (*SLAC1_ARATH*) также отвечает на острое облучение, характеризуясь повышенной экспрессией после острого облучения *A. thaliana* (Duarte et al., 2019). В целом, всего несколько ДЭГ, выявленных в транскриптомах хронически облучаемых деревьев, также отвечают на острое радиационное воздействие. Большинство ДЭГ, реагирующих и на хроническое, и на острое облучение, характеризуются антагонистическим паттерном экспрессии (Duarte et al., 2019).

Для функциональной оценки ДЭГ их классифицировали по терминам Генной Онтологии (GO) и провели анализ функционального обогащения для каждой популяции. Выявлено, что общий ответ деревьев *P. sylvestris* на хроническое облучение связан с контролем клеточного гомеостаза (Duarte et al., 2019). Обогащение по терминам GO, связанным с АФК, наблюдается в популяции Кул, в том числе ответ на пероксид водорода и его трансмембранный транспорт. В популяции Мас преобладают процессы, связанные с элиминацией АФК. Ещё один паттерн ответа в популяции Кул связан с контролем метаболизма белков, имеющих железосерные кластеры и играющих центральную роль в фотосинтезе, стабильности генома, переносе электронов и окислительно-восстановительных реакциях в клетке.

Для ДЭГ с пониженной экспрессией на участках Кул и Мас обнаружили

обогащение по процессам, связанным с ионным гомеостазом и ионным транспортом, а также с регуляцией транскрипции, киназной активностью, с ответами на АФК, кадмий, озон, углекислый газ и фитогормоны (например, ауксины и АБК), а также с регуляцией водного гомеостаза и движениями устьиц.

Обобщение данных транскриптомного анализа позволило выделить основные группы адаптивных реакций в ответ на хроническое облучение: (1) модуляцию накопления АФК путём поддержания баланса между процессами производства АФК и антиоксидантными молекулами; (2) контроль клеточных повреждений за счёт усиления экспрессии генов, кодирующих гистоны и белки теплового шока, сопровождаемой модуляцией ионного баланса, что позволяет противодействовать повреждающим эффектам повышенных концентраций АФК; (3) контроль активности транспозонов.

Важно отметить, что анализ транскриптома не выявил активации процессов репарации в хронически облучаемых популяциях растений, хотя известно, что репарация активируется в условиях острого облучения (Culligan et al., 2006). Это наблюдение можно рассматривать в качестве ещё одной адаптивной реакции популяций на хроническое облучение, поскольку экспрессия генов, кодирующих элементы машинерии репарации, не превышает контрольных значений. Однако хроническое воздействие ионизирующего излучения обуславливает постоянный риск для сохранения целостности макромолекул, в том числе провоцируя возникновение одно- и двунитевых разрывов в ДНК (Caplin, Willey, 2018). Стратегия, выбранная изучаемыми популяциями для поддержания жизнедеятельности в подобных условиях, по-видимому, связана с поддержанием целостности внутриклеточных компонентов за счёт повышения экспрессии генов, кодирующих шапероны и гистоны. Экспрессия генов, кодирующих белки теплового шока, может быть индуцирована несколькими типами стресса, включая окислительный (Al-Whaibi, 2011). Повреждения ДНК обусловливают деградацию гистонов (Hauer et al., 2017) и, хотя экспрессия гистонов обычно связана с клеточным циклом (Jiang, Berger, 2017), существуют предположения, что они также играют роль радиопротекторов (Oleinick et al., 1999), и что их синтез регулируется по принципу обратной связи (Lee et al., 2012). Повышение экспрессии генов,

кодирующих гистоны, может быть связано с восстановлением пула этих белков, необходимых для сохранения целостности молекулы ДНК.

7.3 Однонуклеотидные полиморфизмы в условиях облучения. Учитывая ранее полученные данные о том, что хроническое радиационное воздействие может изменять генетическую структуру популяций растений (Volkova et al., 2017, 2018, Глава 4), было изучено возникновение новых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris*. Принимая во внимание тот факт, что радиационно-индукционные мутации возникают в геноме случайным образом, необычен факт частого появления SNP в геномах хронически облучаемых деревьев в одних и тех же позициях (Рисунок 4), в том числе в географически удалённых популяциях.

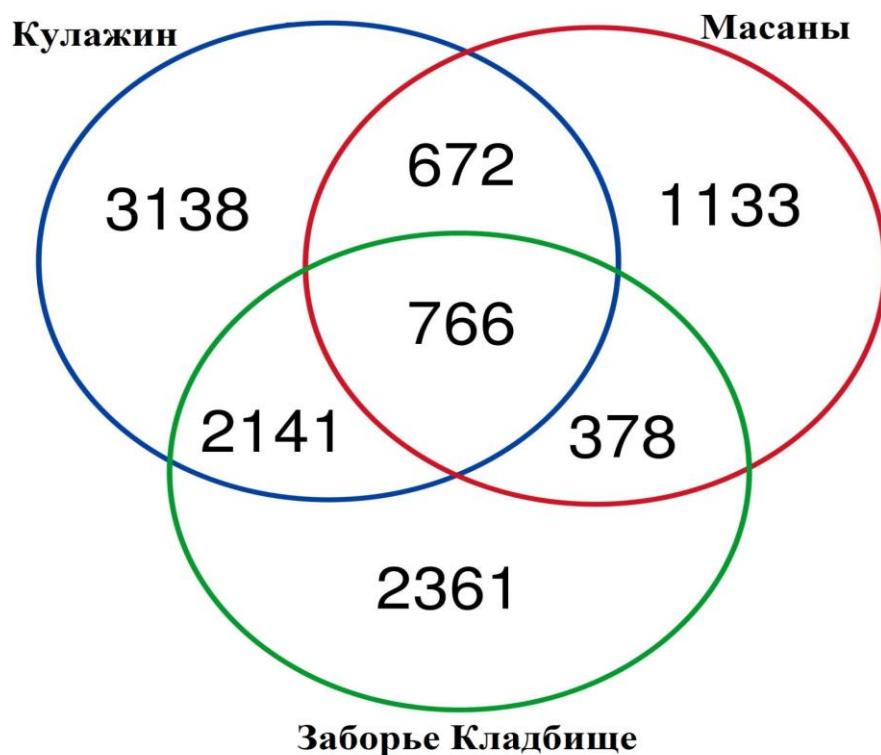


Рисунок 4. Диаграмма Венна, отображающая уникальные и общие SNP в хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris*

При анализе функционального обогащения транскриптов, в которых возникали SNP, было обнаружено обогащение по процессам, связанным с антиоксидантной системой и окислительно-восстановительным гомеостазом.

Таким образом, результаты транскриптомного анализа хвои хронически облучаемых сосен указывают на то, что адаптивные реакции в ответ на хроническое облучение включают в себя модуляцию концентраций АФК за счёт поддержания баланса между процессами производства АФК и антиоксидантными молекулами и контроль клеточных повреждений за счёт усиления экспрессии генов, кодирующих гистоны и белки теплового шока. Однонуклеотидные полиморфизмы также часто возникают в транскриптах, относящихся к антиоксидантной системе и к процессам окисления-восстановления, подтверждая тезис о модуляции уровней АФК в клетках облучённых растений.

ГЛАВА 8. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОРОСТКАХ

H. VULGARE, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОБЛУЧЕНИЕМ СЕМЯН

Ранее было показано, что после острого γ -облучения семян ячменя сорта Нур в диапазоне доз 4-20 Гр проростки таких растений характеризуются увеличенными размерами осевых органов и повышенной биомассой (Geras'kin et al., 2017). Процесс радиационной стимуляции роста целесообразно рассматривать как одну из форм адаптивных реакций растений на действие умеренного стрессора.

8.1 Активность ферментов в проростках облучённых семян. Изменения активности ферментов в проростках облучённых семян *H. vulgare* могут быть частью адаптивной реакции, выражающейся в стимуляции роста растений, облучённых низкими (10-20 Гр) дозами ионизирующего излучения. Ферменты, изученные в представленной работе, играют важную роль в прорастании семян и противодействии стрессу (Волкова и др., 2016). Они входят в состав антиоксидантной системы (каталаза, гвяжоловая пероксидаза), играют ключевую роль в метаболизме глюкозы (пируваткиназа), регулируют пентозофосфатный окислительный путь (ПФЦ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа).

Активность каталазы (CAT), элиминирующей пероксид водорода, не зависела от дозы облучения семян и характеризовалась широким разбросом значений. Активность гвяжоловой пероксидазы (GPx) через три дня прорастания статистически значимо ($r_s = 0.89, p = 0.007$) возрастала с дозой облучения. Очевидно, GPx наиболее активна в ранний период после облучения, принимая участие в элиминации АФК. Активность пируваткиназы была максимальна через три дня

после облучения и не зависела от дозы ($r_s = 0.61$, $p = 0.148$). Через пять и семь дней прорастания активность этого фермента в побегах проростков облучённых семян часто превышает контрольный уровень, что свидетельствует о том, что энергетические процессы в проростках облучённых семян проходят более интенсивно и требуют повышенных концентраций АТФ. Активность глюкозо-б-фосфатдегидрогеназы (G6PDH), важного фермента окислительного ПФЦ, статистически значимо возрастала при дозах 16 и 20 Гр через три дня прорастания. Усиление интенсивности работы пентозофосфатного пути окисления глюкозы относится к неспецифическим реакциям растений на стрессовые воздействия (Yao, Wu, 2016). Таким образом, большинство изученных ферментных систем демонстрировали увеличение активности в диапазоне доз 10-20 Гр, в котором ранее наблюдали стимуляцию роста проростков (Geras'kin et al., 2017).

8.2 Анализ концентраций фитогормонов в проростках облучённых семян.

Фитогормоны являются ключевыми регуляторами роста и развития растений, поэтому изменение фитогормонального баланса в тканях облучённых растений может являться одной из причин радиационной стимуляции роста. В представленной работе изучали концентрации индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), индолилмасляной кислоты (ИМК), зеатина и абсцизовой кислоты (АБК), а также изменения в балансе этих фитогормонов в результате облучения. Показан сдвиг фитогормонального баланса в сторону фитогормонов-стимуляторов роста (ИУК, ИМК, зеатин) при облучении семян ячменя обычновенного низкими дозами облучения (4-20 Гр) или в сторону ингибитора роста АБК при облучении семян ингибирующей дозой 50 Гр (Таблица 5).

Таблица 5 – Отношение концентраций гормонов-стимуляторов прорастания к концентрации гормона-ингибитора прорастания (АБК) в органах растений, выросших из облучённых семян ячменя.

Доза	День									
	3		4		5		6		7	
	пр	П	К	П	К	П	К	П	К	
0	1.78	1.44	12.50	0.70	15.73	1.28	26.18	1.53	38.18	

Продолжение Таблицы 5

4	18.50	2.88	48.83	5.93	44.95	4.19	35.12	4.52	9.97
8	5.04	1.56	7.85	2.01	18.55	4.33	18.95	3.89	21.92
12	11.78	3.30	10.42	1.72	34.44	3.53	36.08	5.88	59.60
16	18.78	6.95	77.68	5.14	40.15	4.85	29.59	4.49	47.54
20	11.23	3.36	46.27	4.27	67.33	4.11	56.27	3.66	45.23
50	5.66	0.85	0.94	0.42	1.92	0.53	0.84	0.58	1.72

Примечание: пр – проросток; п – побег, к – корень.

Обнаруженное увеличение отношения концентраций гормонов-стимуляторов роста к ингибитору по сравнению с контролем во всех органах проростков ячменя, выросших из облучённых семян, может быть связано со стимуляцией роста и развития растений ячменя, продемонстрированной ранее (Geras'kin et al., 2017). Дозы облучения 16 и 20 Гр, максимально увеличивали отношение концентраций фитогормонов-активаторов роста к АБК (Таблица 5).

8.3 Анализ концентраций пероксида водорода в проростках облучённых семян. Под действием ионизирующего излучения в клетках растений происходит радиолиз воды, приводящий к избытку АФК, которые изменяют структурные и функциональные свойства биологических макромолекул, что приводит к каскадным изменениям в метаболических путях растения. Изучение концентраций пероксида водорода H_2O_2 как наиболее стабильной АФК проводили на тех же семенах, что использовались для анализа функциональных изменений транскриптома зародышей облучённых семян (Глава 9). Для анализа концентраций пероксида водорода в проростках использовали стимулирующую (15 Гр) и ингибирующую (100 Гр) дозы облучения семян. Концентрации H_2O_2 в проростках облучённых семян были значимо повышены по сравнению с контролем для большинства изученных временных точек (Таблица 6).

Таблица 6 – Содержание пероксида водорода в облучённых семенах и тканях проростков.

Время от начала прорастания	Орган	Доза (Гр)	Содержание пероксида водорода в навеске			Уровень значимости р	
			Q1	M	Q3	vs. K	15 vs. 100 Гр
			мкМ				
24 ч	<i>Семя</i>	K	1.41	1.45	1.52		
		15	0.71	1.11	1.18	0.009*	0.003*
		100	1.31	1.46	2.47	0.650	
48 ч	<i>Семя</i>	K	0.30	0.33	0.37		
		15	0.85	1.13	1.52	0.002*	0.025*
		100	0.51	0.65	0.70	0.006*	
72 ч	<i>Проросток</i>	K	1.51	1.58	1.68		
		15	1.83	1.94	2.10	0.003*	0.006*
		100	1.57	1.59	1.65	0.650	
96 ч	<i>Побег</i>	K	5.90	6.10	6.38		
		15	7.56	8.09	8.40	0.009*	0.347
		100	7.49	7.68	7.73	0.009*	
	<i>Корень</i>	K	1.76	1.88	1.89		
		15	1.59	1.67	1.67	0.075	0.009*
		100	1.22	1.25	1.32	0.009*	
120 ч	<i>Побег</i>	K	3.60	3.62	3.84		
		15	6.72	8.02	8.47	0.009*	0.175
		100	5.47	5.71	7.58	0.016*	
	<i>Корень</i>	K	2.66	2.98	3.36		
		15	1.67	1.68	2.06	0.028*	0.465
		100	1.93	2.09	2.09	0.009*	
144 ч	<i>Побег</i>	K	1.80	1.88	2.47		
		15	4.51	4.54	5.64	0.009*	0.624
		100	4.70	4.78	4.83	0.014*	
	<i>Корень</i>	K	1.56	1.78	2.10		
		15	2.54	2.74	2.98	0.016*	0.009*
		100	1.10	1.14	1.32	0.076	
168 ч	<i>Побег</i>	K	2.64	3.24	3.68		
		15	2.47	2.76	3.10	0.371	0.117
		100	3.48	3.77	3.91	0.371	
	<i>Корень</i>	K	2.02	2.20	2.27		
		15	1.16	1.29	1.73	0.117	0.917
		100	1.20	1.22	1.32	0.016*	

Примечание: К – контрольные необлучённые семена; М – медиана; Q1 – первый квартиль; Q3 – третий квартиль; * – значимые отличия от контроля ($p < 0.05$, U-критерий Манна-Уитни).

Побеги характеризовались существенно повышенными концентрациями пероксида водорода по сравнению с корнями (Volkova et al., 2019), что может быть

связано с производством АФК в процессе фотосинтеза (Smirnoff, Arnaud, 2018). Максимальное содержание H₂O₂ было обнаружено через 96 и 120 ч после начала прорастания облучённых семян (Таблица 6).

Таким образом, показано, что облучение семян *H. vulgare* как низкими, так и высокими дозами ИИ приводит к изменению ряда биохимических показателей проростков. Так, ферменты основных путей метаболизма и антиоксидантной системы в основном характеризовались повышенной активностью в проростках после облучения семян низкими дозами ИИ. Выявлены изменения концентраций фитогормонов в процессе прорастания и влияние ИИ на особенности их накопления в органах проростков. По-видимому, фитогормональная и антиоксидантная системы и ферменты, контролирующие основные пути метаболизма, участвуют в формировании адаптивных реакций растений ячменя в ответ на низкодозовое облучение на ранних этапах онтогенеза. Выявлено, что облучение приводит к накоплению пероксида водорода в органах проростков облучённых семян, причём такое накопление более выражено при облучении низкими дозами ИИ.

Глава 9. ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЗАРОДЫШАХ ОБЛУЧЁННЫХ СЕМЯН *H. VULGARE*

9.1 Морфологический анализ облучённых растений. Одновременно с анализом дифференциальной экспрессии генов была проведена оценка морфологических характеристик проростков облучённых семян ячменя урожая того же года, который использовали для выделения тотальной РНК. Стимуляция роста корней и побегов была выявлена через 7 дней после начала прорастания при облучении в дозе 20 Гр, при этом различия в росте с контролем были более очевидны для корней, чем для побегов. Длина и масса корней и побегов растений, облучённых в ингибирующей дозе 100 Гр, были значимо ниже, чем в контроле, демонстрируя ингибирование роста растений при облучении семян высокими дозами γ -излучения. Анализ микрофенологических фаз прорастания контрольных и облучённых семян показал, что облучение в высокой дозе замедляет переход проращающих семян к

фазе фотосинтезирующего проростка, а низкодозовое облучение стимулирует его (Volkova et al., 2019).

9.2 Дифференциальная экспрессия генов и анализ функционального обогащения. Для анализа транскриптома зародышей облучённых семян ячменя использовали метод кДНК-микрочипов. Семена проращивали сразу после облучения. Исследовали временные точки 2, 24 и 48 ч после начала прорастания для стимулирующей рост дозы 20 Гр, для ингибирующей дозы 100 Гр исследовали только временную точку 24 ч. Данные, полученные при анализе ДНК-микрочипов, были верифицированы при помощи ОТ-кПЦР (Volkova et al., 2019). При анализе функционального обогащения выявленных дифференциально экспрессирующихся генов для условия «20 Гр, 48 ч» было выявлено обогащение по процессам, связанным с процессами фотосинтеза. Транскриптом зародышей, облучённых в ингибирующей дозе 100 Гр, характеризовался обогащением по терминам, связанным с контролем клеточной организации и деления (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты анализа обогащения терминами GO для выборки дифференциально экспрессирующихся генов.

Домен	Термин GO	Описание	p-value
20 Гр, 24 ч			
Клеточный компартмент	GO:0031225	прикреплённый к мембране	$3.5 \cdot 10^{-5}$
20 Гр, 48 ч			
Биологический процесс	GO:0015979	фотосинтез	$1.8 \cdot 10^{-14}$
	GO:0009765	фотосинтез, улавливание света	$3.7 \cdot 10^{-11}$
	GO:0019684	фотосинтез, световые реакции	$9.4 \cdot 10^{-9}$
	GO:0018298	связь «белок-хромофор»	$9.2 \cdot 10^{-9}$
	GO:0006091	производство предшественников метаболитов и энергии	$2.2 \cdot 10^{-5}$
Молекулярная функция	GO:0016168	связывание хлорофилла	$3.2 \cdot 10^{-10}$
	GO:0046906	связывание тетрапиррола	$9.9 \cdot 10^{-6}$
Клеточный компартмент	GO:0009521	фотосистема	$1.7 \cdot 10^{-19}$
	GO:0009522	фотосистема I	$7.2 \cdot 10^{-18}$
	GO:0034357	фотосинтетическая мембрана	$2.8 \cdot 10^{-12}$
	GO:0042651	мембрана тилакоида	$2.2 \cdot 10^{-11}$
	GO:0009523	фотосистема II	$1.9 \cdot 10^{-11}$
	GO:0005576	внеклеточная область	$7.7 \cdot 10^{-5}$
	GO:0005618	клеточная стенка	0.0005
100 Гр, 24 ч			
Биологический процесс	GO:0051301	клеточное деление	$4.1 \cdot 10^{-6}$
	GO:0007049	клеточный цикл	$2 \cdot 10^{-5}$

Продолжение Таблицы 7

Молекулярная функция	GO:0008017	связывание с микротрубочками	$1.4 \cdot 10^{-5}$
	GO:0046982	гетеродимеризация белка	$9.1 \cdot 10^{-6}$
	GO:0015631	связывание тубулина	$3.6 \cdot 10^{-5}$
Клеточный компартмент	GO:0000786	нуклеосома	$1.8 \cdot 10^{-9}$
	GO:0000785	хроматин	$7.8 \cdot 10^{-7}$
	GO:0009524	фрагмопласт	$1.4 \cdot 10^{-6}$
	GO:0005874	микротрубочка	$1.6 \cdot 10^{-6}$
	GO:0005694	хромосома	$1.2 \cdot 10^{-5}$
	GO:0031225	прикреплённый к мемbrane	$2.1 \cdot 10^{-5}$
	GO:0005576	внеклеточная область	$8 \cdot 10^{-5}$
	GO:0005871	кинезиновый комплекс	0.0006

Показано, что низкие и высокие дозы облучения семян приводят к контрастным профилям экспрессии генов зародышей. При облучении в высоких дозах происходит активация ответа на повреждения ДНК и окислительный стресс. Также обнаружены транскрипционные свидетельства подавления передачи сигналов АБК в ответ на облучение в низкой дозе и индукция ответа на жасмонат и цитокинины, что вновь позволяет предположить, что стимулирующий эффект облучения в низких дозах зависит и от модуляции уровней фитогормонов. В свою очередь, фитогормональный сигналинг взаимосвязан с сигналингом АФК, и, по-видимому, может участвовать в поддержании повышенных концентраций пероксида водорода в тканях облучённых растений. Транскриптомный анализ также указывает на то, что формирование адаптивных реакций растений на облучение может зависеть от оптимизации уровней пероксида водорода. Другим возможным объяснением ускорения роста и развития после облучения в низких дозах является сдвиг в развитии облучённых растений, на что указывают как данные транскриптомики, так и анализ микрофенологических фаз прорастания контрольных и облучённых семян (Volkova et al., 2019).

Глава 10. АНАЛИЗ МЕТАБОЛОМА ПРОРОСТКОВ ОБЛУЧЁННЫХ СЕМЯН *H. VULGARE*

В данной главе представлены результаты работы по анализу метаболома проростков облучённых семян ячменя и выявленные метаболические процессы, связанные со стимуляцией роста проростков ячменя после облучения семян.

10.1 Фенотип растений, использованных для метаболомного анализа.
Облучение в дозах 5, 15 и 20 Гр привело к статистически значимому увеличению

длины побегов. Облучение в ингибирующей дозе 100 Гр привело к резкому снижению линейных размеров органов проростков.

10.2 Общие метаболические изменения в тканях облучённых растений.

Обработка экспериментальных данных позволила выделить ряд метаболитов, концентрации которых значимо изменялись в тканях облучённых растений. В целом, значимые метаболиты в корнях характеризовались сниженными концентрациями по сравнению с необлучёнными растениями, тогда как в побегах наблюдали увеличение концентраций. Стимулирующие дозы 15 и 20 Гр характеризовались наибольшим количеством значимых метаболических изменений. Упрощённая схема метаболизма проростков облучённых семян ячменя представлена на Рисунке 5.

10.3 Изменения метаболизма азота в проростках ячменя после низкодозового облучения семян.

Полученные экспериментальные данные указывают на эффективное перераспределение азота между метаболитами, вовлечёнными в его транспорт и хранение (аргинин, глутамин, аспарагин, ГАМК), что может быть связано с фенотипическими проявлениями радиационной стимуляции.

10.4 Метаболиты стрессового ответа.

Умеренные повреждения в клетках растений, облучённых низкими дозами γ -излучения, приводят к мобилизации запасных веществ эндосперма даже в условиях ограниченной доступности ресурсов для роста (дистиллированная вода, темнота). Данные показывают перераспределение доступного азота среди органов облучённых растений и между разными метаболическими процессами. По-видимому, метаболизм аргинина играет важную роль в этом перераспределении, приводя к накоплению азота, главным образом, в листьях проростков. Аскорбатная система, мио-инозитол и его производные, свободные аминокислоты (серин, β -аланин, пипеколат, ГАМК) могут вносить вклад в формирование эффекта сверхкомпенсации, что приводит к стимуляции роста после умеренного стрессового воздействия.

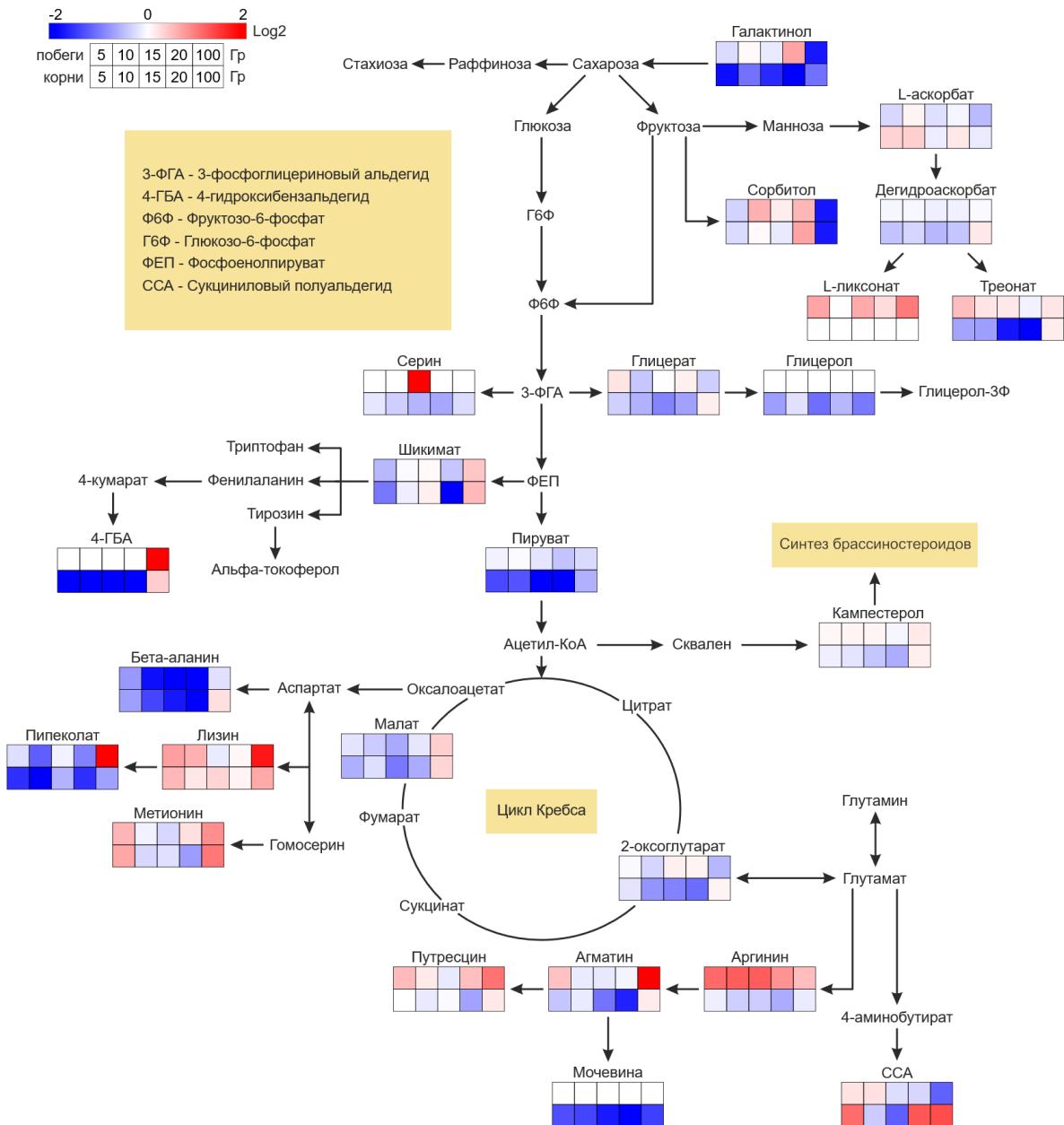


Рисунок 5. Метаболическая схема, отражающая взаимодействия между метаболитами, значимо отличающимся от контроля в корнях и побегах облучённых растений

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. КОНЦЕПТУАЛЬНАЯ СХЕМА РАЗВИТИЯ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В НИЗКИХ ДОЗАХ

В диссертационной работе представлены основные результаты многолетней экспериментальной работы по анализу радиобиологических реакций растений на облучение в низких дозах. Эксперименты проведены на разных уровнях

биологической организации с применением современных подходов молекулярной биологии. Комплексная работа, проведённая при анализе молекулярных и биохимических особенностей действия ионизирующего излучения разной интенсивности и длительности на растения, позволила сформулировать некоторые общие закономерности адаптивного ответа на облучение, которые обобщены на Рисунке 6.

Первичные активные формы кислорода и прямые повреждения, обусловленные облучением, вызывают неспецифический стрессовый ответ, приводящий к производству вторичных АФК и модуляции окислительно-восстановительного гомеостаза. Ответ клетки на облучение контролируется как ядерными сигналами, так и ретроградным сигналингом органелл, включая митохондрии, хлоропласти и эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Эпигенетические модификации и изменения экспрессии транскрипционных факторов приводят к перестройке метаболизма клеток для поддержания гомеостаза в условиях стресса.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли клеточных мембран в формировании адаптивных реакций на облучение в низких дозах. Подавление работы НАДФН-оксидаз и снижение ионного транспорта могут быть как активными процессами, инициированными для контроля окислительно-восстановительного гомеостаза облучённых клеток, так и пассивным следствием ухудшения состояния мембран, о чём свидетельствует рост концентраций МДА и пероксида водорода в клетках облучённых растений.

Изменение окислительно-восстановительного гомеостаза хлоропластов приводит к модуляции процессов фотосинтеза и синтеза компонентов фотосистем, включая белки с железосерными кластерами, служащие компонентами ЭТЦ и участвующие в контроле концентраций АФК. Взаимосвязь хлоропластов и митохондрий через процесс фотодыхания опосредует ретроградный сигналинг и изменения окислительно-восстановительного баланса обеих органелл. Процессы, происходящие в органеллах, содержащих ЭТЦ, вызывают производство вторичных АФК, поддерживают процессы стрессового ответа даже после окончания действия стрессора. Митохондрии через сигналинг инозитола взаимодействуют с ЭПР, что

приводит к синтезу шаперонов и шапероноподобных белков и к запуску системы внутриклеточного контроля качества белков.



Рисунок 6. Концептуальная схема взаимодействия клеточных компонентов при формировании адаптивных реакций на низкодозовое облучение. Красными стрелками показана интенсификация процесса, зелёными – его супрессия

Таким образом, сочетанная активация антиоксидантной системы, фитогормонального сигналинга, системы контроля качества белков приводит к метаболическим изменениям и к формированию адаптированного фенотипа, носители которого могут успешно существовать и размножаться в условиях низкодозового облучения.

Полученные в рамках диссертационной работы данные об ответных реакциях разных видов растений на острое и хроническое воздействие ионизирующего излучения имеют важное значение для обоснования новых принципов экологического нормирования, разрабатываемых в настоящее время рядом международных организаций (МКРЗ, МСР, МАГАТЭ). Экспериментальные данные по адаптивным реакциям растений, произрастающих в зоне Чернобыльской аварии,

необходимы для оценки адаптивного потенциала компонентов биосфера в условиях меняющегося климата и усиливающейся техногенной нагрузки на экосистемы. Помимо этого, изучение хронического воздействия ионизирующей радиации разного качества на растения в течение многих поколений также необходимо для научного обоснования проектов долговременных космических перелётов, где растительные системы будут играть важную роль в питании космонавтов и в функционировании систем жизнеобеспечения. Данные о конкретных молекулярных путях, опосредующих адаптивные реакции в ответ на облучение, имеют прикладное значение и могут быть использованы в биотехнологии растений для получения стрессоустойчивых сортов сельскохозяйственных культур. Информация о последствиях хронического облучения природных экосистем и острого облучения сельскохозяйственных культур необходима для обеспечения населения актуальной научной информацией в целях борьбы с повсеместным распространением радиофобии, препятствующей усилению внедрения радиационных технологий и атомной энергетики в экономику РФ.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены общие закономерности адаптивных реакций растений на острое и хроническое облучение в низких дозах, включающие синтез шаперонов и шапероноподобных белков, ответ системы фотосинтеза, контроль уровней АФК.
2. Независимое использование изоферментных и ДНК-маркеров позволило выявить изменения генетической структуры популяций *P. sylvestris*, произрастающих на загрязнённых радионуклидами территориях (мощности поглощённых доз до 100 мГр/год). Обнаружено дозозависимое возрастание частоты мутаций в локусах, кодирующих изоферменты.
3. Анализ компонентов антиоксидантной системы хронически облучаемых популяций *P. sylvestris* указывает на модуляцию уровней АФК системой низкомолекулярных антиоксидантов.
4. Эпигенетические процессы и активность транспозонов отличаются в контрольных и хронически облучаемых популяциях *P. sylvestris*, но не зависят от дозы в изученном диапазоне доз (до 100 мГр/год).
5. Транскриптомный анализ тканей *P. sylvestris* выявил, что адаптивные реакции в ответ на хроническое облучение включают в себя модуляцию концентраций АФК

и ионного баланса, а также контроль клеточных повреждений за счёт усиления экспрессии генов, кодирующих гистоны и белки теплового шока.

6. Однонуклеотидные полиморфизмы в геноме *P. sylvestris* в условиях хронического облучения часто возникают в транскриптах, относящихся к антиоксидантной системе и к процессам окисления-восстановления, подтверждая тезис о модуляции уровней АФК в клетках облучённых растений.

7. Облучение семян *H. vulgare* как низкими (4-20 Гр), так и высокими (50-100 Гр) дозами ионизирующего излучения приводит к ряду биохимических изменений, включая повышению активности ферментов основных путей метаболизма и антиоксидантной системы в проростках. Выявлены изменения отношения концентраций фитогормонов-стимуляторов и ингибитора роста в процессе прорастания. Обнаружено, что облучение приводит к накоплению пероксида водорода в проростках облучённых семян, в большей степени после облучения низкими дозами ионизирующего излучения.

8. Низкие (15-20 Гр) и высокие (100 Гр) дозы острого облучения семян *H. vulgare* формируют контрастные профили экспрессии генов зародышей. Обнаружены транскриptionные свидетельства подавления передачи сигналов АБК в ответ на облучение в низкой дозе и индукция ответа на жасмонат и цитокинины, что позволяет предположить взаимосвязь стимулирующего эффекта облучения в низких дозах и модуляции уровней фитогормонов. Транскриптомный анализ также указывает на то, что формирование адаптивных реакций растений на облучение может зависеть от оптимизации уровней пероксида водорода.

9. Облучение низкими дозами γ -излучения приводит к мобилизации запасных веществ эндосперма даже в условиях ограниченной доступности ресурсов для роста (дистиллированная вода, темнота). Показано перераспределение доступного азота между органами облучённых растений и разными метаболическими процессами. Метаболизм аргинина играет важную роль в этом перераспределении, приводя к накоплению азота, главным образом, в листьях проростков. Аскорбатная система, мио-инозитол и его производные, свободные аминокислоты (серин, β -аланин, пипеколат, ГАМК) могут вносить вклад в стимуляцию роста после умеренного стрессового воздействия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Volkova, P.Yu.** Early response of barley embryos to low- and high-dose gamma-irradiation of seeds triggers changes in the transcriptional profile and an increase of hydrogen peroxide content in seedlings / P.Yu. Volkova, G.T. Duarte, L. Soubigou-Taconnat et al. // Journal of Agronomy and Crop Science. – 2019. doi: doi.org/10.1111/jac.12381.
2. Duarte, G.T. The response profile to chronic radiation exposure based on the transcriptome analysis of Scots pine from Chernobyl affected zone / G.T. Duarte, **P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin** // Environmental Pollution. – 2019. – V. 250. – P. 618-626.
3. Geras'kin, S. Scots pine as a promising indicator organism for biomonitoring of the polluted environment: A case study on chronically irradiated populations / S. Geras'kin, **P. Volkova, D. Vasiliyev** et al. // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2019. – V. 842. – P. 3-13.
4. **Volkova, P.Yu.** ‘Omic’ technologies as a helpful tool in radioecological research / P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin // Journal of Environmental Radioactivity. – 2018. – V. 189. – P. 156-167.
5. **Volkova, P.Yu.** Chronic radiation exposure as an ecological factor: hypermethylation and genetic differentiation in irradiated Scots pine populations / P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin, N. Horemans et al. // Environmental Pollution. – 2018. – V. 232. – P. 105-112.
6. Гераськин, С.А. Эффекты хронического облучения в популяциях растений на примере референтного организма «сосна обыкновенная». Обзор / С.А. Гераськин, **П.Ю. Волкова, А.А. Удалова и др.** // Радиация и риск. – 2018. – Т. 27. – № 4. – С. 95-118.
7. Битаришвили, С.В. Влияние гамма-облучения семян ячменя на содержание фитогормонов в динамике прорастания / С.В. Битаришвили, **П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин** // Физиология растений. – 2018. – Т. 65. – № 3. – С. 223-232.
8. **Volkova, P.Yu.** Radiation exposure in the remote period after the Chernobyl accident caused oxidative stress and genetic effects in Scots pine populations / P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin, E.A. Kazakova // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – 43009.
9. Geras'kin, S.A. Radiation exposure of barley seeds can modify the early stages of plants' development / S.A. Geras'kin, R.S. Churyukin, **P.Yu. Volkova** // Journal of Environmental Radioactivity. – 2017. – V. 171. – P. 71-83.

10. Geras'kin, S. Influence of long-term chronic exposure and weather conditions on Scots pine populations / S. Geras'kin, D. Vasiliyev, E. Makarenko, **P. Volkova** et al. // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – V. 24(12). – P. 11240-11253.
11. Казакова, Е.А. Анализ изменений генетической структуры хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной / Е.А. Казакова, **П.Ю. Волкова**, С.А. Гераськин // Экологическая генетика. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 50-61.
12. Geras'kin, S.A. The consequences of chronic radiation exposure of Scots pine in the remote period after the Chernobyl accident / S.A. Geras'kin, N.S. Dikareva, A.A. Oudalova, D.V. Vasil'ev, **P.Yu. Volkova** // Russian Journal of Ecology. – 2016. – V. 47(1). – P. 25-37.
13. **Волкова, П.Ю.** Влияние γ -облучения семян на активность ферментов в проростках ячменя / П.Ю. Волкова, Р.С. Чурюкин, С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – Т. 56. – № 2. – С. 190-196.
14. Казакова, Е.А. Полиморфизм глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной / Е.А. Казакова, **П.Ю. Волкова**, С.А. Гераськин, Д.О. Помелова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55. – № 4. – С. 389-394.
15. Geras'kin, S.A. Genetic diversity in Scots pine populations along a radiation exposure gradient / S.A. Geras'kin, **P.Yu. Volkova** // Science of the Total Environment. 2014. – V. 496. – P. 317-327.
16. **Volkova, P.Yu.** Enzyme polymorphism of an antioxidant system in chronically irradiated scots pine populations / P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2014. – V.4(5). – P. 421-433.
17. **Волкова, П.Ю.** Активность ферментов антиоксидантной системы у сосны обыкновенной в условиях хронического облучения / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин, Н.И. Раевская // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т.54. – № 2. – С. 174- 178.
18. **Волкова, П.Ю.** Анализ полиморфизма супероксиддисмутазы в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52. – № 4. – С. 370-380.

**В других периодических изданиях и сборниках трудов, в том числе в
сборниках тезисов российских и международных конференций, по теме
диссертации опубликованы 82 работы.**