

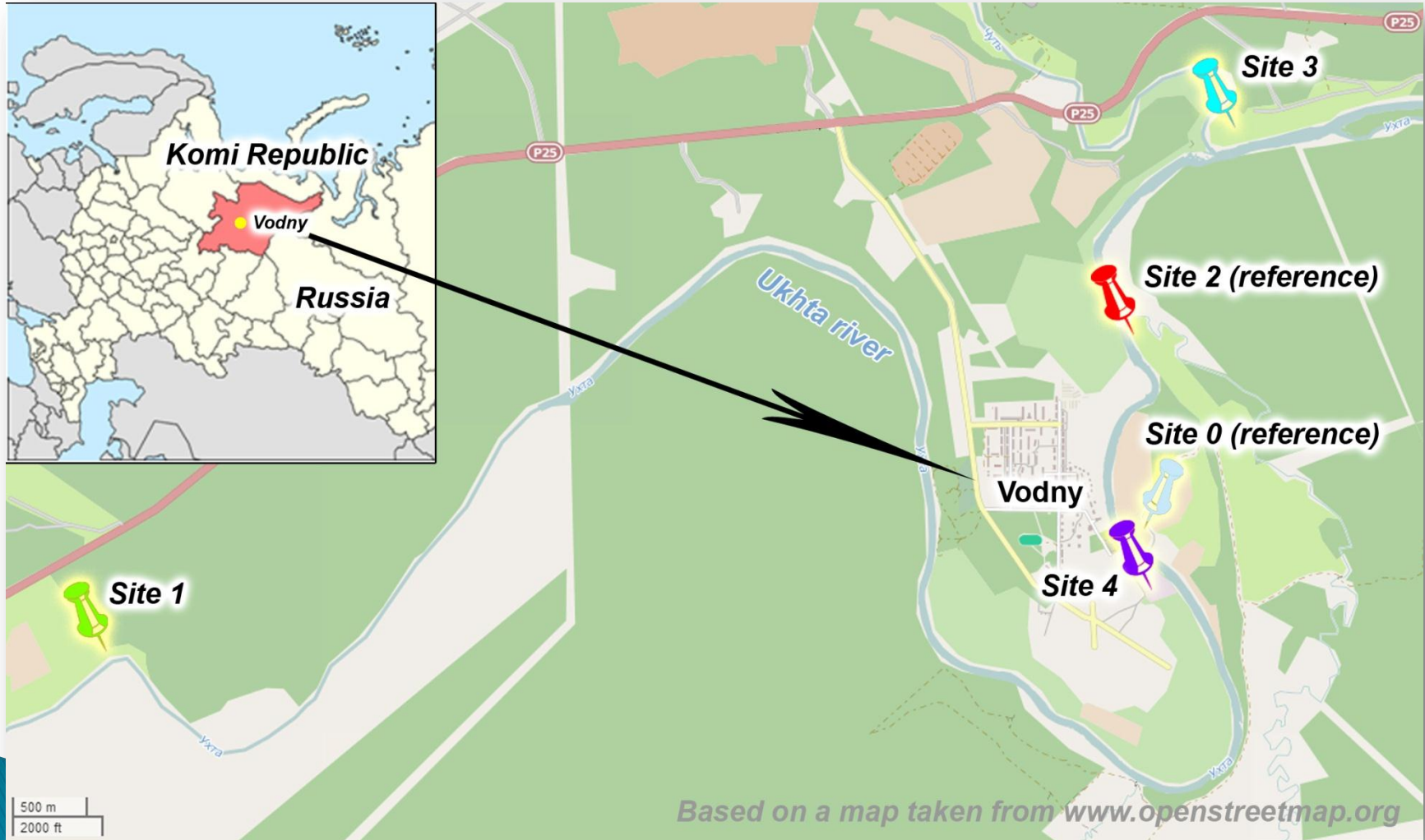
ОЦЕНКА МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ, ДОЛГОЕ ВРЕМЯ НАСЕЛЯЮЩИХ ПОЧВЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ РАДИОНУКЛИДОВ И ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Велегжанинов И.О., Канева А.В., Майстренко Т.А.,
Белых Е.С., Шадрин Д.М., Пылина Я.И., Чадин И.Ф.
(Отдел радиозэкологии и ЦКП «Молекулярная биология»)

Цель исследования

- ▶ Оценить адаптационные и микроэволюционные изменения, произошедшие в популяциях дождевых червей, долгое время обитающих в почвах с высоким содержанием радионуклидов и тяжёлых металлов

Экспериментальные участки



Содержание радионуклидов

Радионуклид	Site 0	Site 1	Site 2	Site 3 (крохаль)	Site 4 (свалка)	Искусственная почва
^{238}U	n. a.	11.5 ± 0.8	8.8 ± 1.3	17.1 ± 1.4	306 ± 120	4.7 ± 0.9
^{232}Th	4.1 ± 0.3	20.3 ± 4.7	14.0 ± 4.2	18.0 ± 4.0	45.4 ± 8.8	1.8 ± 0.5
^{230}Th	45 ± 20	21.7 ± 4.1	19.3 ± 0.5	50 ± 12	2342 ± 837	3.8 ± 1.1
^{228}Th	4.4 ± 1.0	14.7 ± 3.0	12.9 ± 5.0	18.2 ± 5.2	31.1 ± 7.3	5.2 ± 1.6
^{226}Ra	70 ± 23	163 ± 41	33.4 ± 2.9	878 ± 245	22260 ± 4779	7.8 ± 1.2
^{210}Po	58 ± 24	396 ± 86	128.8 ± 5.3	1602 ± 393	62454 ± 9809	11.9 ± 1.8
^{210}Pb	81 ± 22	60 ± 14	46.1 ± 9.2	286 ± 86	4337 ± 1653	10.2 ± 1.5

Содержание тяжёлых металлов

Радионуклид	Site 0	Site 1	Site 2	Site 3 (крохаль)	Site 4 (свалка)	Искусственная почва
Cu	10.8 ± 1.0	7.3 ± 0.4	8.5 ± 0.3	18.8 ± 0.4	134 ± 35	7.3 ± 1.5
Pb	14.4 ± 1.5	6.0 ± 0.3	7.1 ± 0.9	12.9 ± 0.4	408 ± 85	4.2 ± 1.1
Cd	n. a.	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	1.5 ± 0.1	14.0 ± 3.4	0.12 ± 0.06
Zn	n. a.	62.0 ± 2.8	52.7 ± 2.9	118.6 ± 3.3	141 ± 23	20 ± 4
Ni	n. a.	16.8 ± 0.7	17.8 ± 0.5	40.4 ± 1.0	44.7 ± 9.1	16 ± 6
Co	n. a.	6.3 ± 0.3	9.3 ± 0.3	10.7 ± 0.4	14.2 ± 2.6	4.6 ± 1.8
Cr	n. a.	17.6 ± 0.8	19.8 ± 0.8	22.8 ± 0.7	20.7 ± 3.4	12.7 ± 2.5
As	5.2 ± 0.8	2.4 ± 0.1	3.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2	143 ± 35	2.6 ± 1.3
Hg	n. a.	0.023 ± 0.002	0.017 ± 0.001	0.049 ± 0.001	0.507 ± 0.095	0.008 ± 0.004

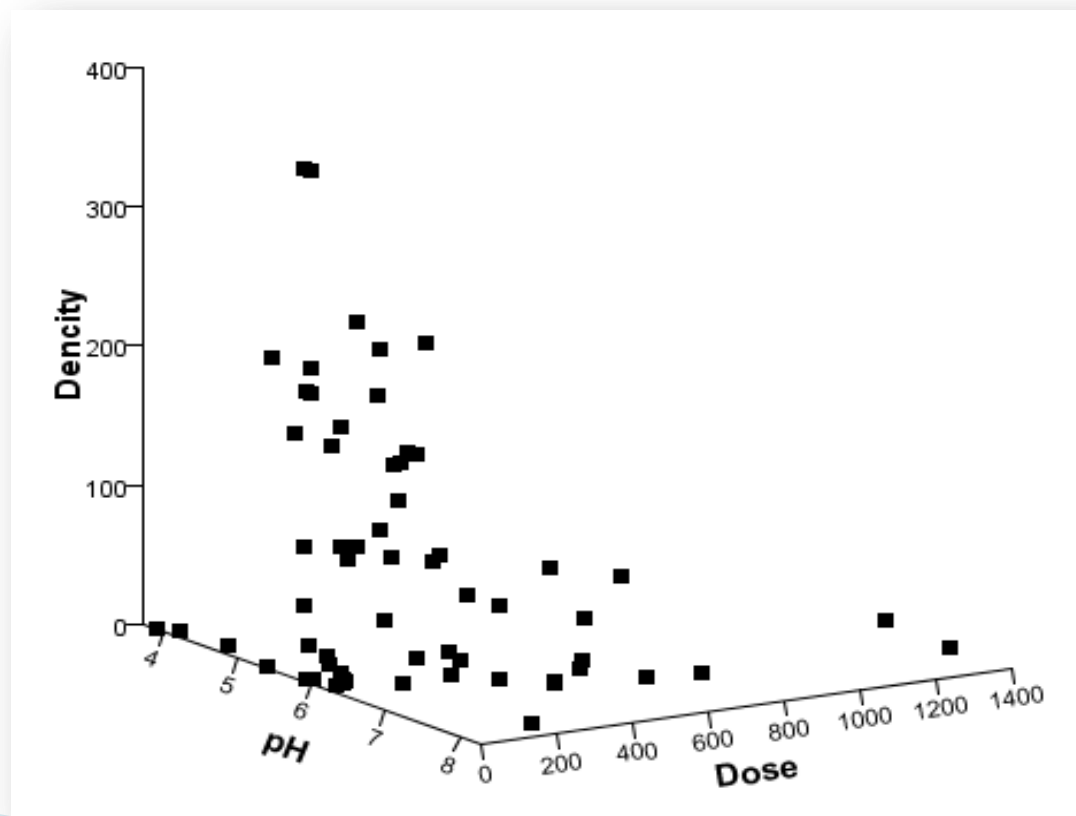
**Отличается ли численность
дождевых червей в почвах
загрязнённых и
референтных участков?**

Изменение плотности популяции дождевых червей в зависимости от рН почвы и поглощенной дозы

	Sites 0–2 (Контроль)	Site 3	Site 4
Численность, инд/м ²	174 ± 58 (64-272)	221 ± 93 (96-368)	35 ± 35* (0-112)

Плотность – число особей в пласте почвы:
100×100×25 см

Доза – мкгр/ч



Численность снижена, но
спустя множество
десятилетий черви в
загрязнённой почве есть

Самоподдержание
популяции

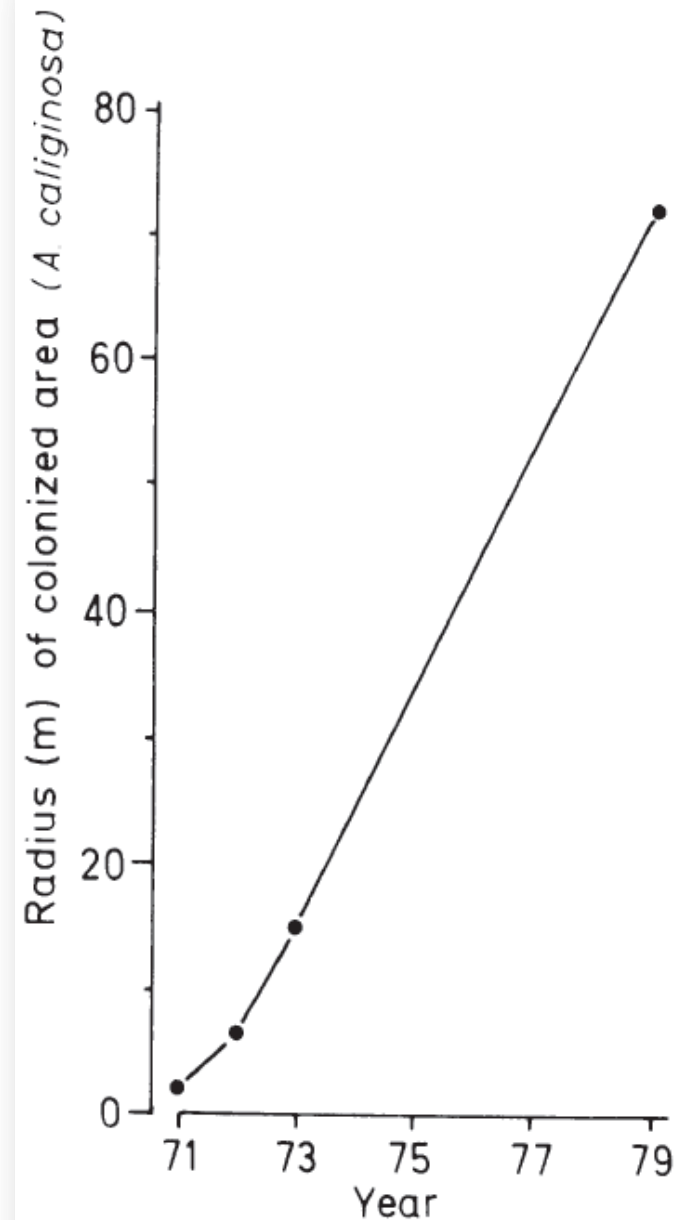
Постоянное заселение
территории извне



Маловероятно

Hoogerkamp, M., Rogaar, H., Eijsackers, H.J.P., 1983. Effects of earthworms on grassland on recently reclaimed polder soils in the Netherlands. In: Satchell JE (Eds.), *Earthworm Ecology: from Darwin to vermiculture*, Chapman and Hall, London, 85-105.

Миграционная
способность червей
составляет около
10 м/год



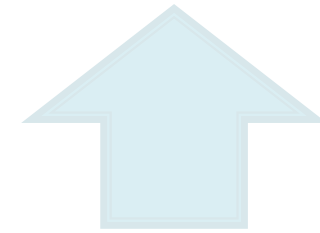
Численность снижена, но
спустя множество
десятилетий черви в
загрязнённой почве есть

Самоподдержание
популяции



Возможность для
движущего отбора и
адаптации

Постоянное заселение
территории извне



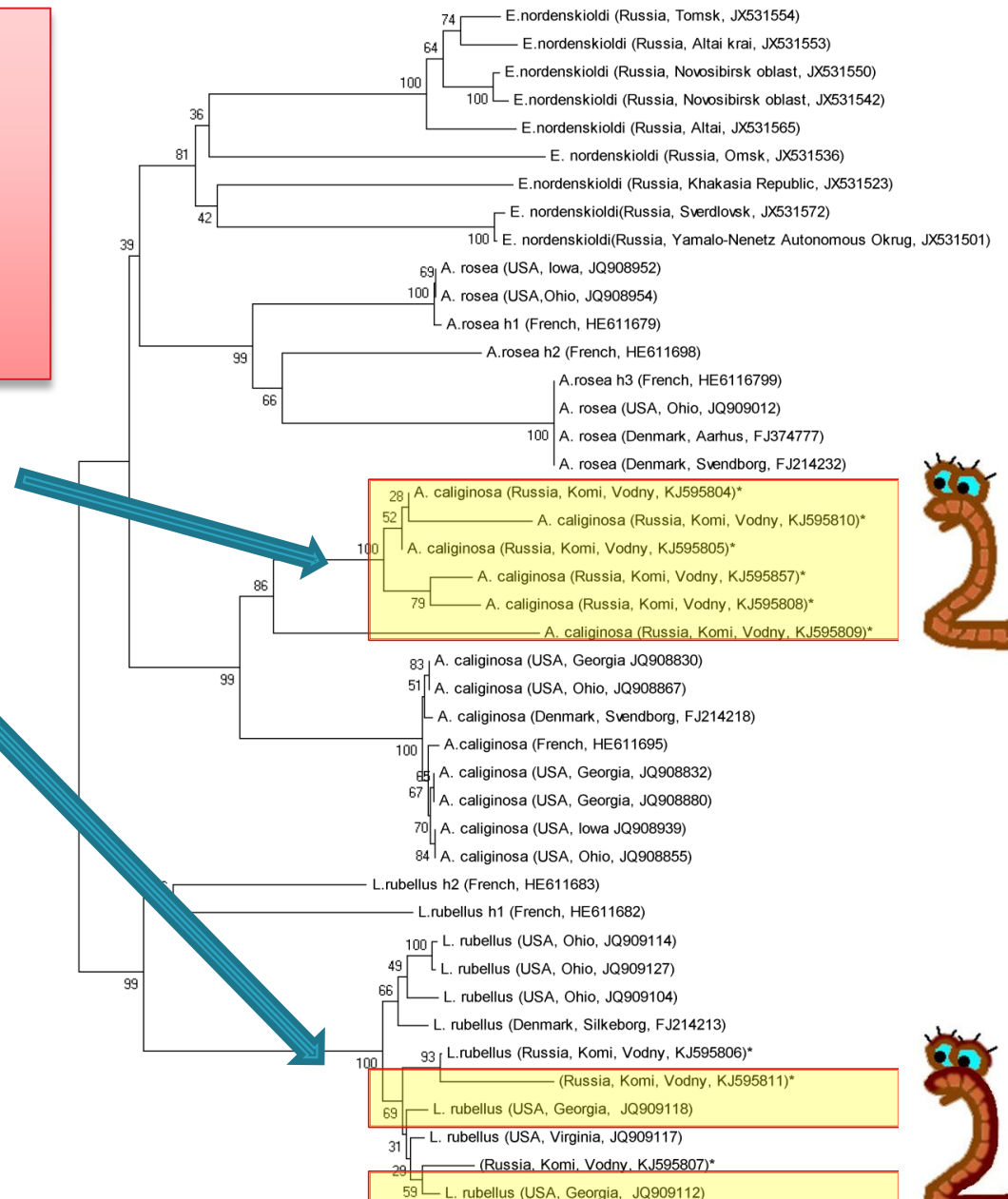
Маловероятно

С какими червями мы имеем дело?

Aporrectodea caliginosa

Lumbricus rubellus

На основе последовательности нуклеотидов митохондриального гена COI

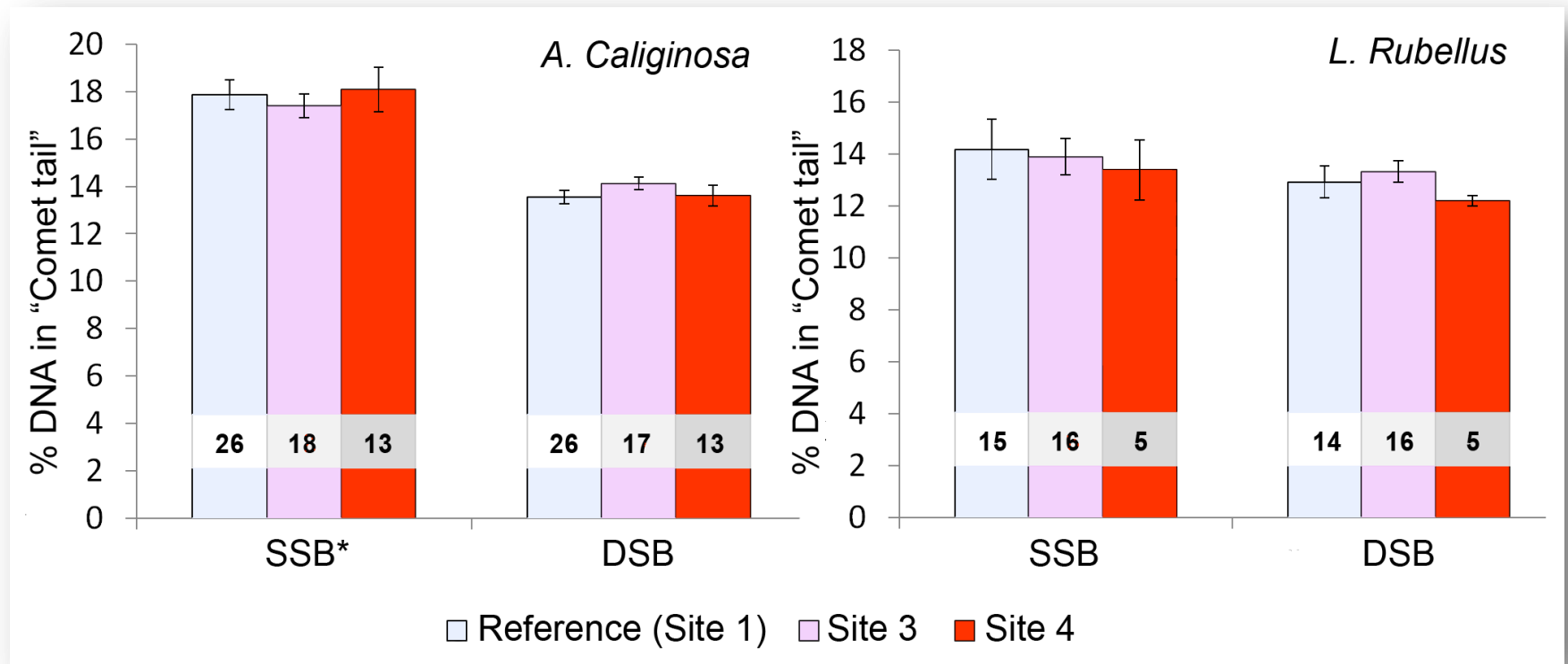


Радионуклиды и тяжёлые металлы – это генотоксические агенты. Есть ли признаки генотоксического стресса?



Оценка фоновых уровней повреждений ДНК

Уровень повреждений ДНК целомоцитов



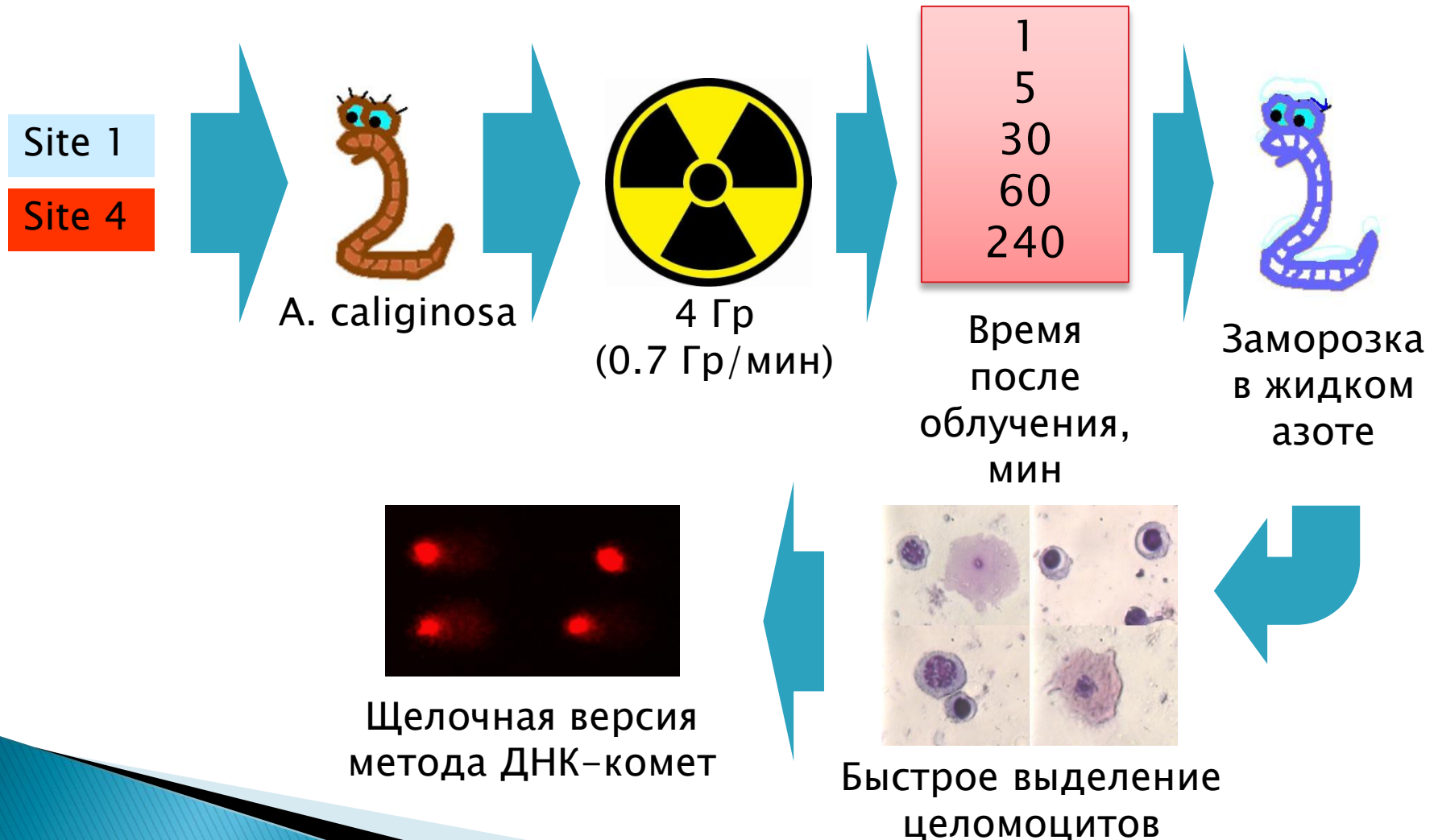
не различается у червей с загрязнённых
и контрольного участков

Может ли это быть результатом усиленной репарации ДНК в клетках червей, обитающих в загрязнённой почве?

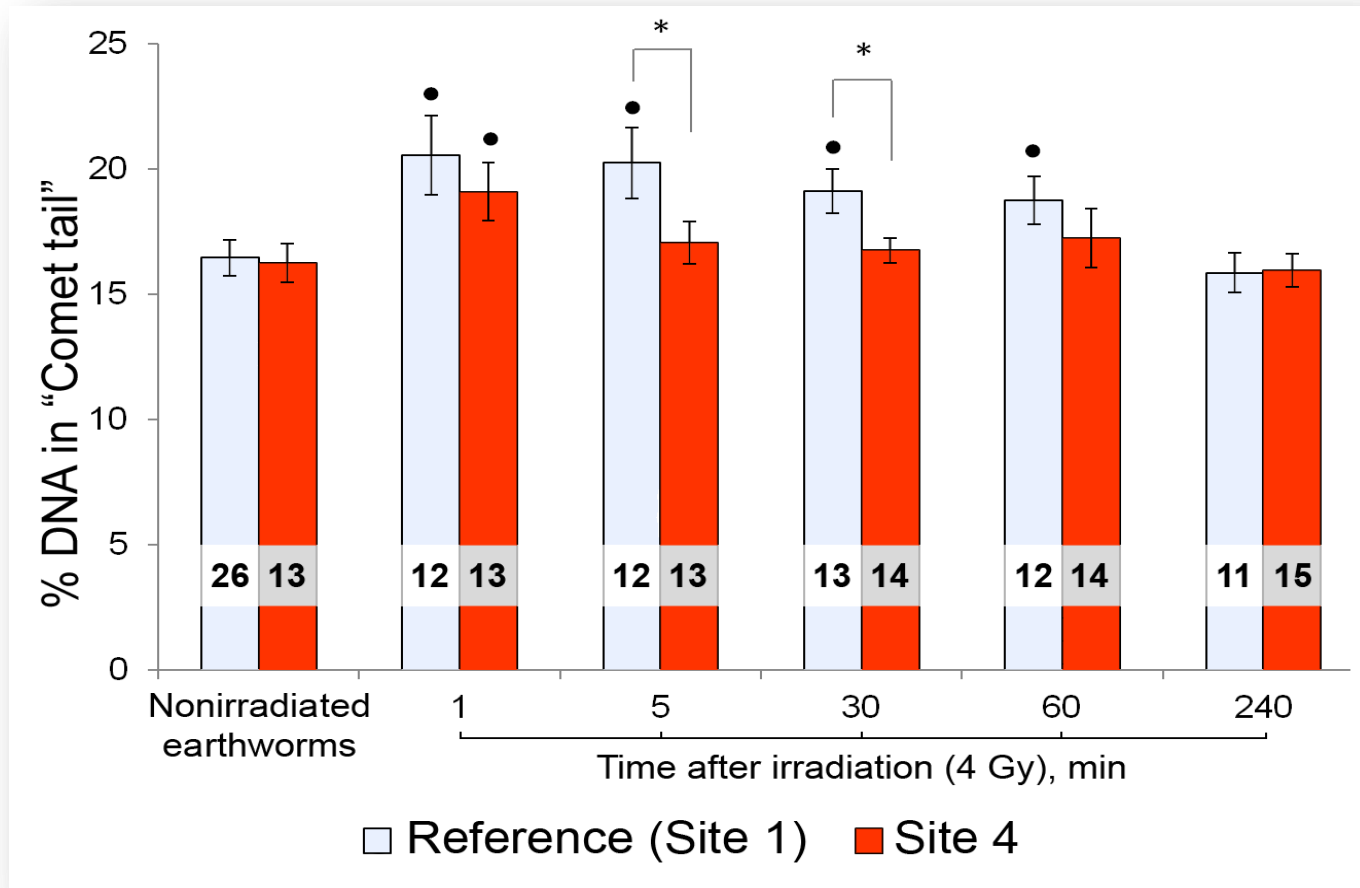


Оценка скорости репарации ДНК

Схема анализа скорости репарации ДНК



Скорость репарации ДНК



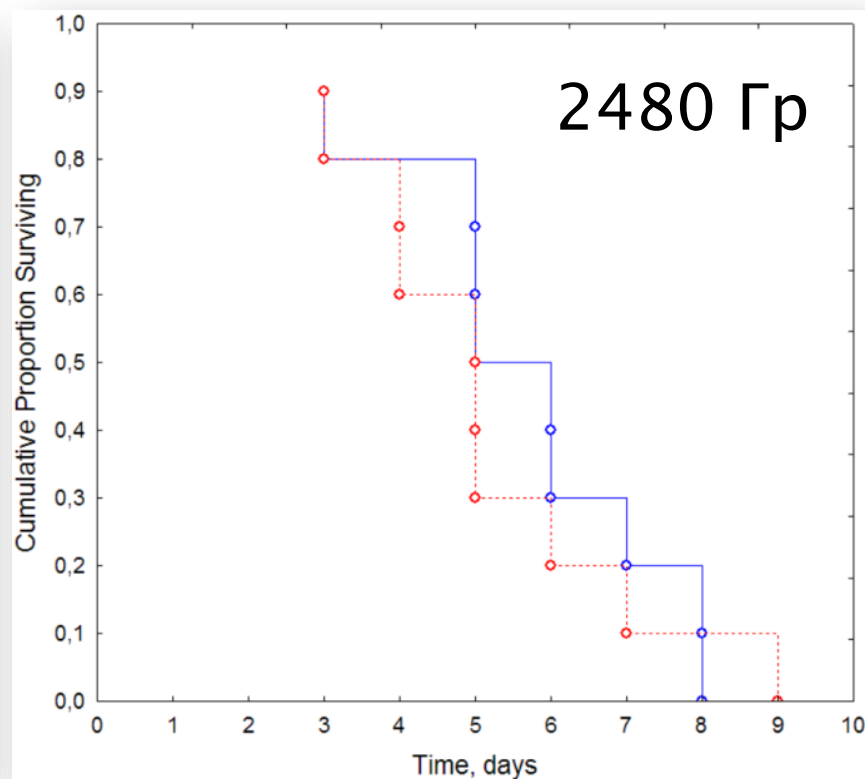
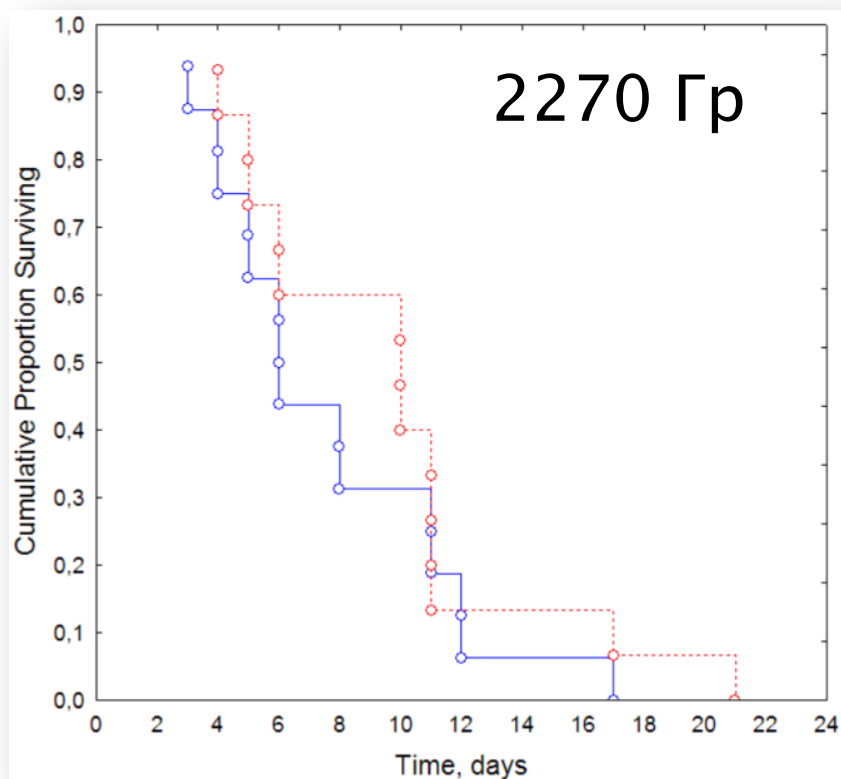
выше в клетках червей, обитающих в
загрязнённой почве

**Увеличена ли устойчивость к
дополнительному
радиационному и токсическому
стрессу по интегральному
показателю – выживаемости?**



**Оценка выживаемости червей после острого
воздействия ионизирующего излучения и
высоких концентраций кадмия**

Устойчивость к острому облучению в высоких дозах



- Черви с участка 1
- - - Черви с участка 4

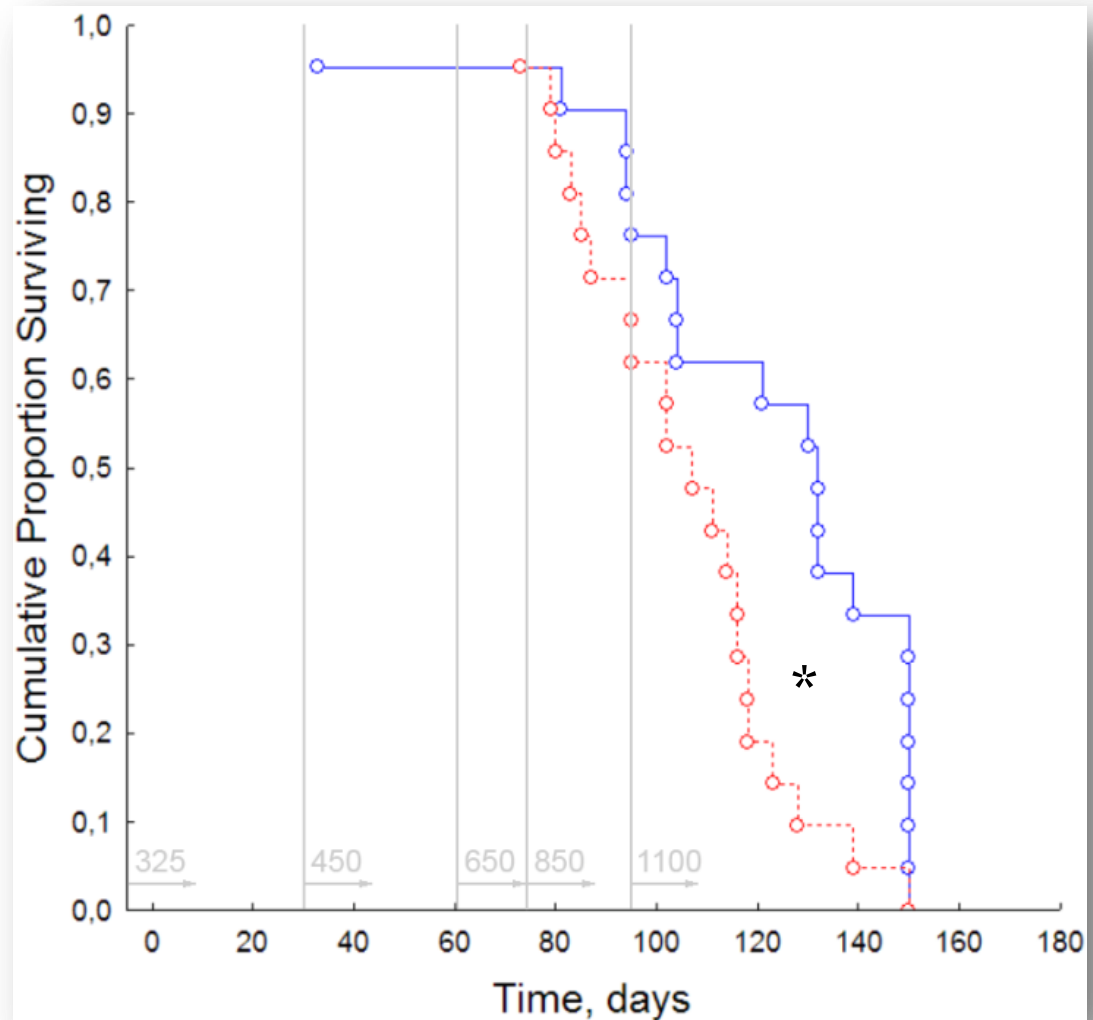
не увеличивается

Устойчивость к высоким концентрациям кадмия снижается

— Черви с участка 1
- - - Черви с участка 4

Серыми линиями и числами указано повышение концентрации кадмия в почве во время эксперимента (325–1100 мг/кг).

* – различия между кривыми достоверны при $p = 0.0069$

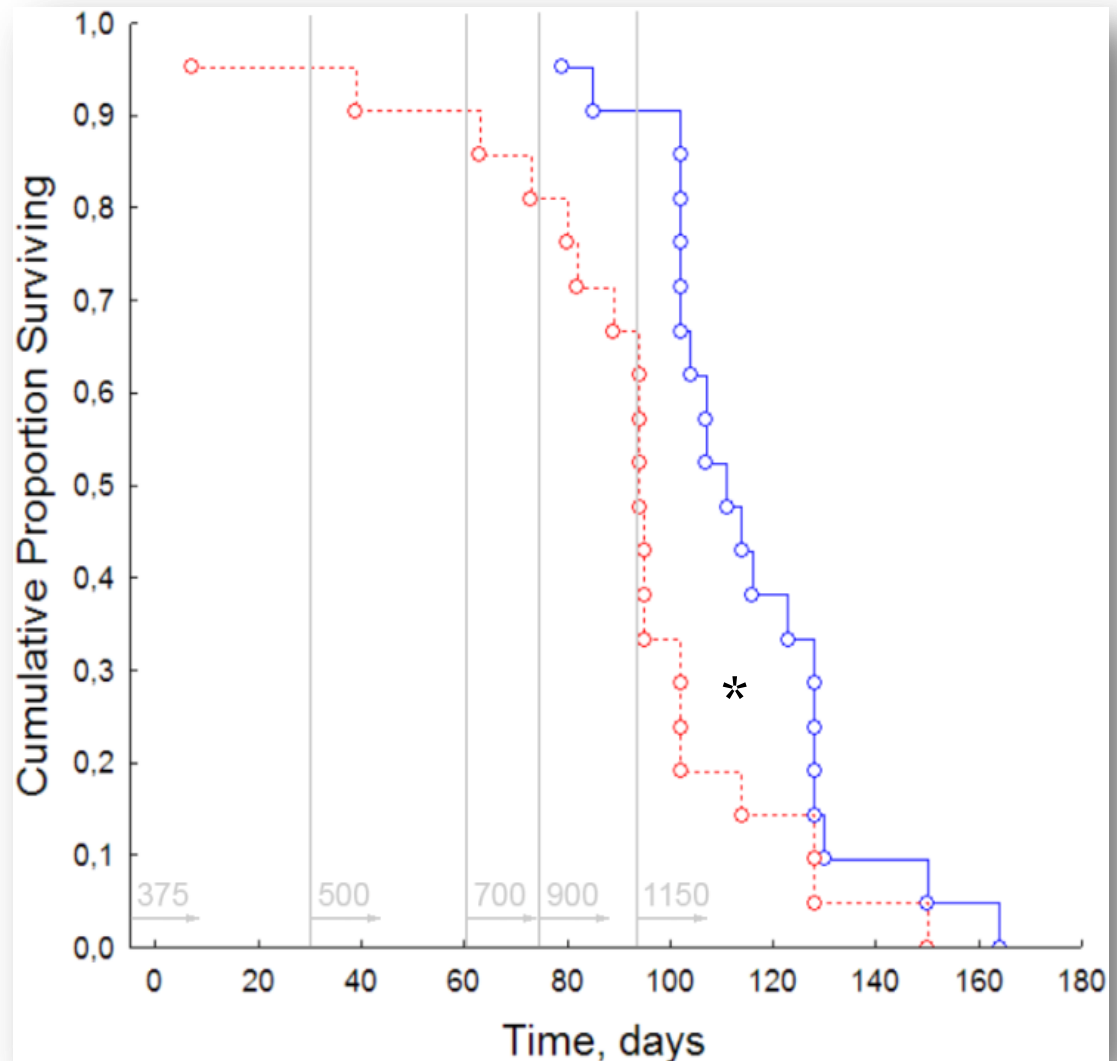


Устойчивость к высоким концентрациям кадмия снижается

— Черви с участка 1
- - - Черви с участка 4

Серыми линиями и числами указано повышение концентрации кадмия в почве во время эксперимента (375–1150 мг/кг).

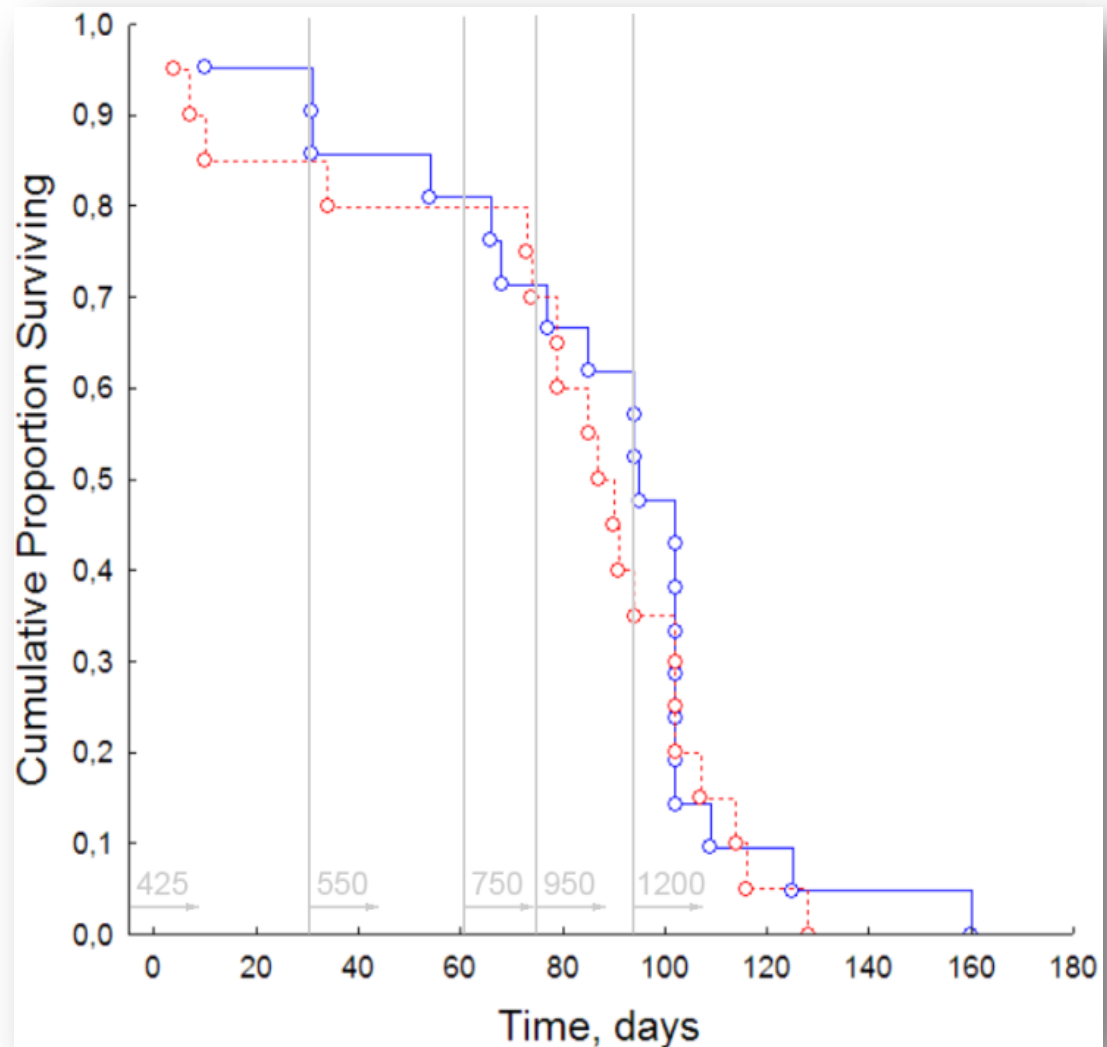
* – различия между кривыми достоверны при $p = 0.0078$



Устойчивость к высоким концентрациям кадмия снижается

— Черви с участка 1
- - - Черви с участка 4

Серыми линиями и числами указано повышение концентрации кадмия в почве во время эксперимента (425–1200 мг/кг).



Произошли ли какие-либо микроэволюционные изменения (независимо, нейтральные или адаптивные)?



Оценка степени схожести геномов особей из популяций населяющих загрязнённые и контрольные почвы и уровня внутреннего генетического разнообразия популяций

Анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP)

- Site 1
- Site 2
- Site 3
- Site 4



A. caliginosa



Выделение ДНК



Рестрикция с помощью *EcoRI* и *MseI*



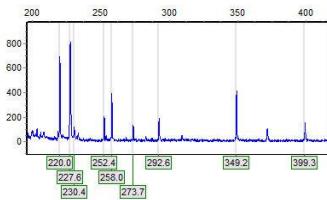
Лигирование адаптеров



Неселективная амплификация



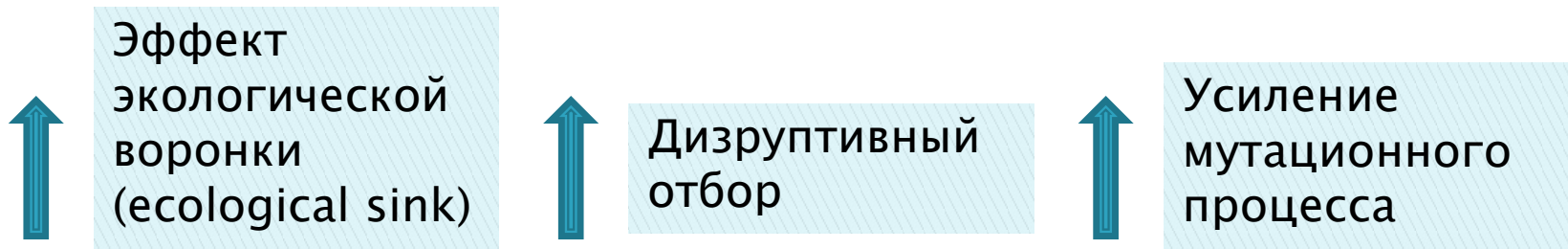
Селективная амплификация



	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele N
Sample 1	0	0	0	0	0	0
Sample 2	0	0	0	0	0	0
Sample 3	0	1	0	1	0	1
Sample 4	0	0	0	0	1	0
Sample 5	1	0	0	0	1	0
Sample 6	0	0	0	0	1	0
Sample M	0	0	0	0	0	0

Преобразование хроматограммы в бинарную матрицу

Капиллярный электрофорез с высоким разрешением

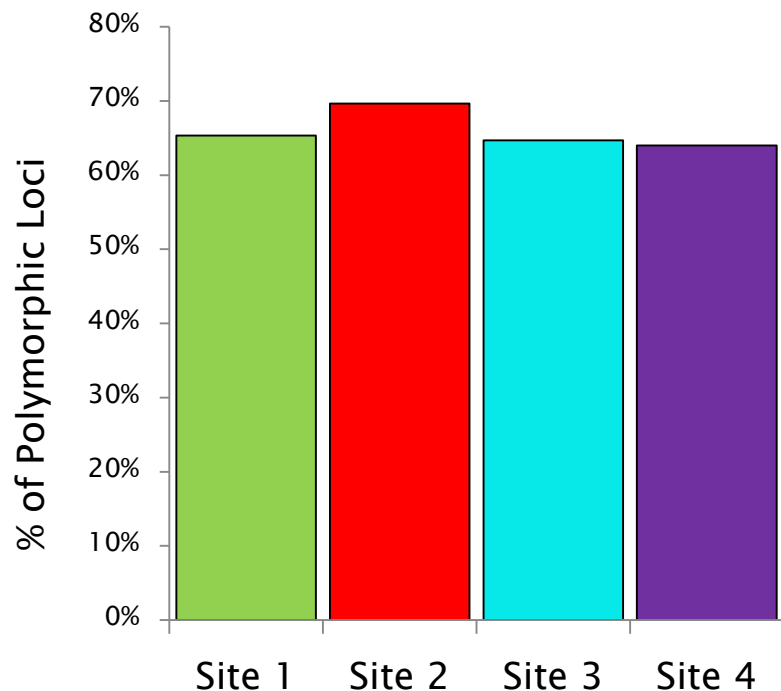


Генетическое разнообразие популяции

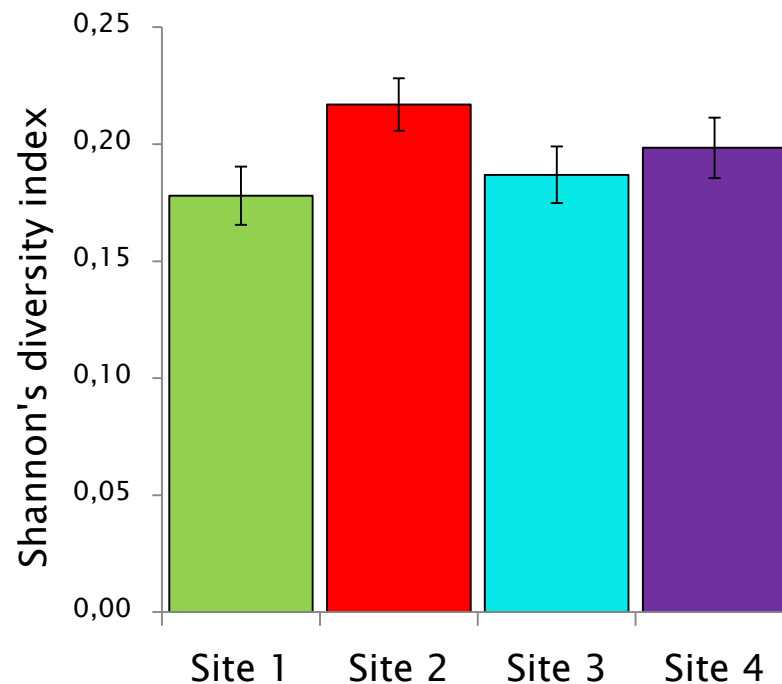


- van Straalen, N.M., Timmermans M.J.T.N., 2002. Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations: An Evaluation of the “Genetic Erosion” Hypothesis, Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 8:5, 983–1002.
- Fasola, E., Ribeiro, R., Lopes, I., 2015. Microevolution due to pollution in amphibians: A review on the genetic erosion hypothesis. Environ Pollut. 204, 181–90.
- Matson, C.W., Lambert, M.M., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Donnelly, K.C., Islamzadeh, A., Politov, D.I., Bickham, J.W., 2006. Evolutionary toxicology: population-level effects of chronic contaminant exposure on the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. Environ Health Perspect. 114(4), 547–52.

Доля полиморфных локусов



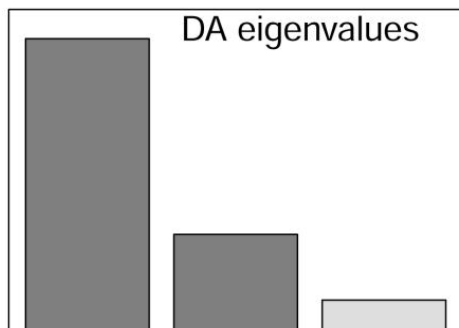
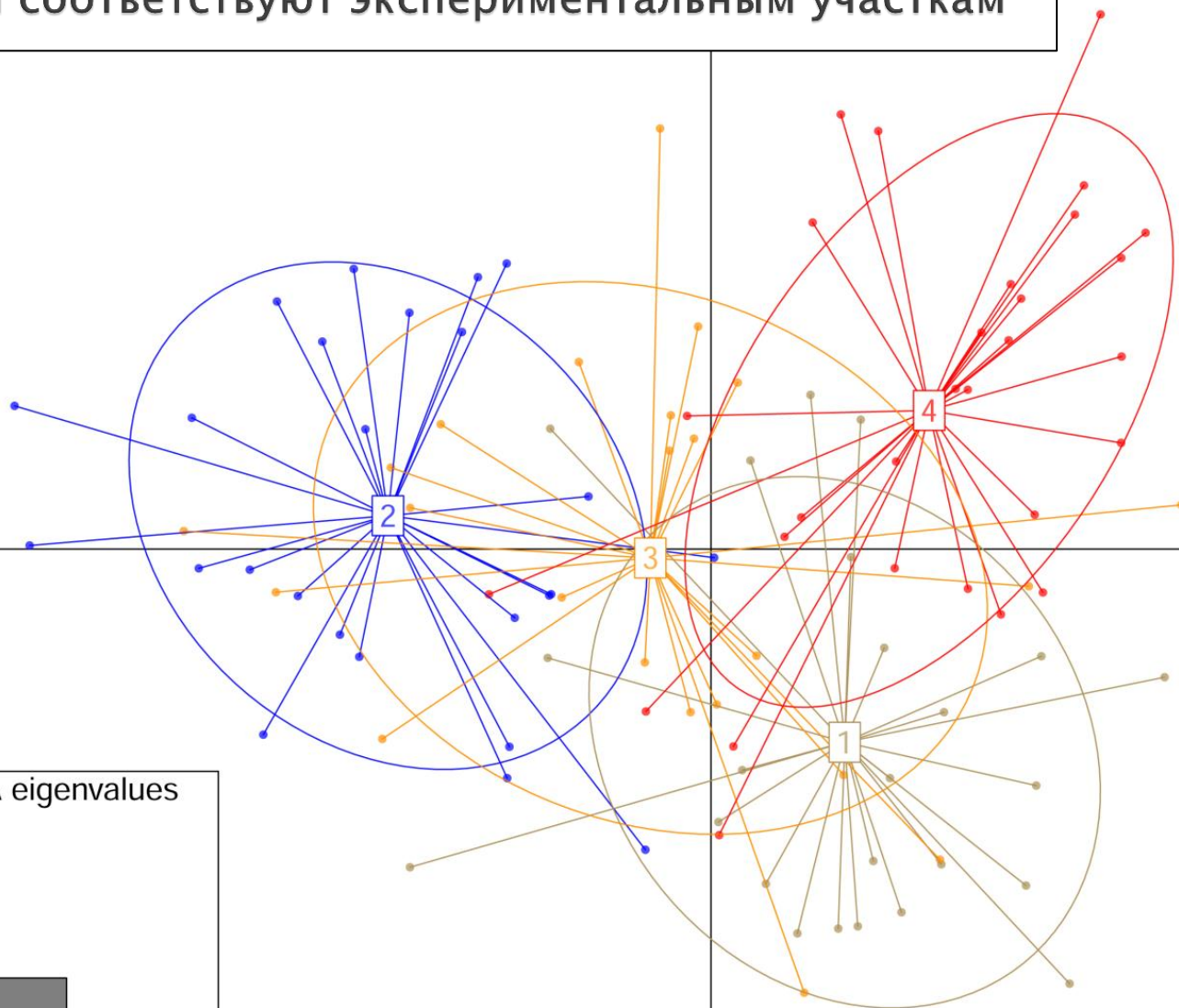
Индекс разнообразия Шеннона



Может произошло расхождение популяций *A. caliginosa* обитающих в почвах с различным уровнем загрязнения?

Дискриминантный анализ главных компонент (DAPC)

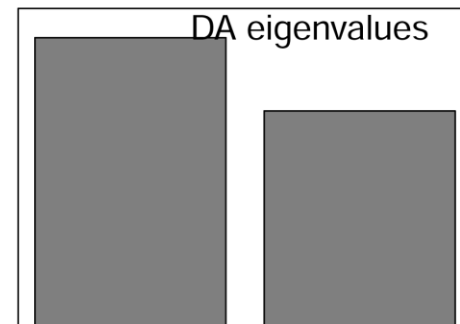
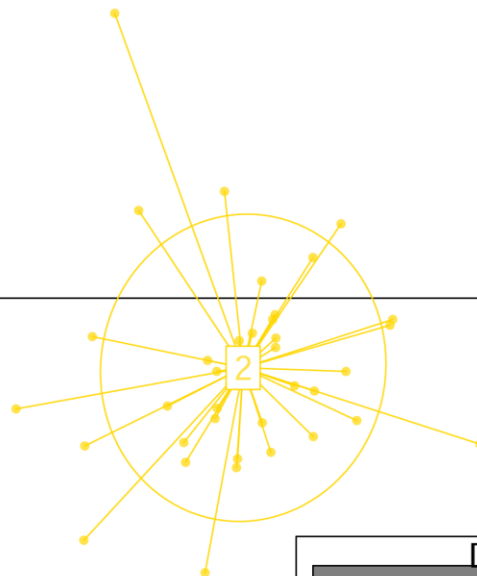
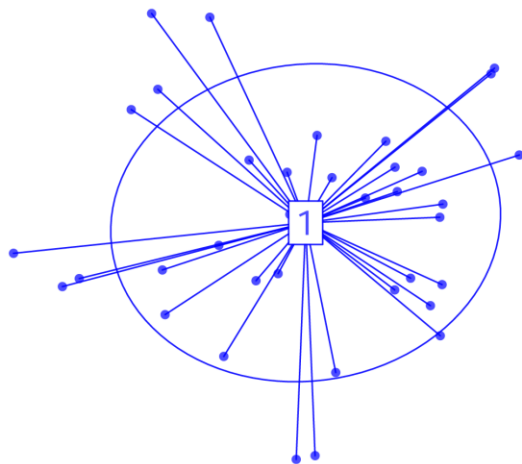
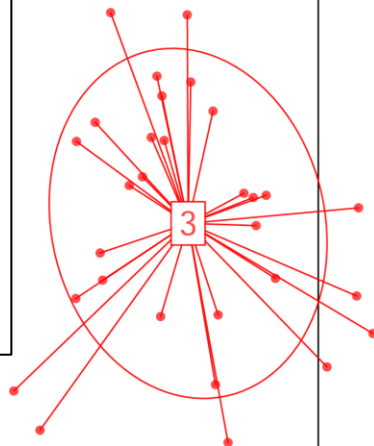
Группы соответствуют экспериментальным участкам



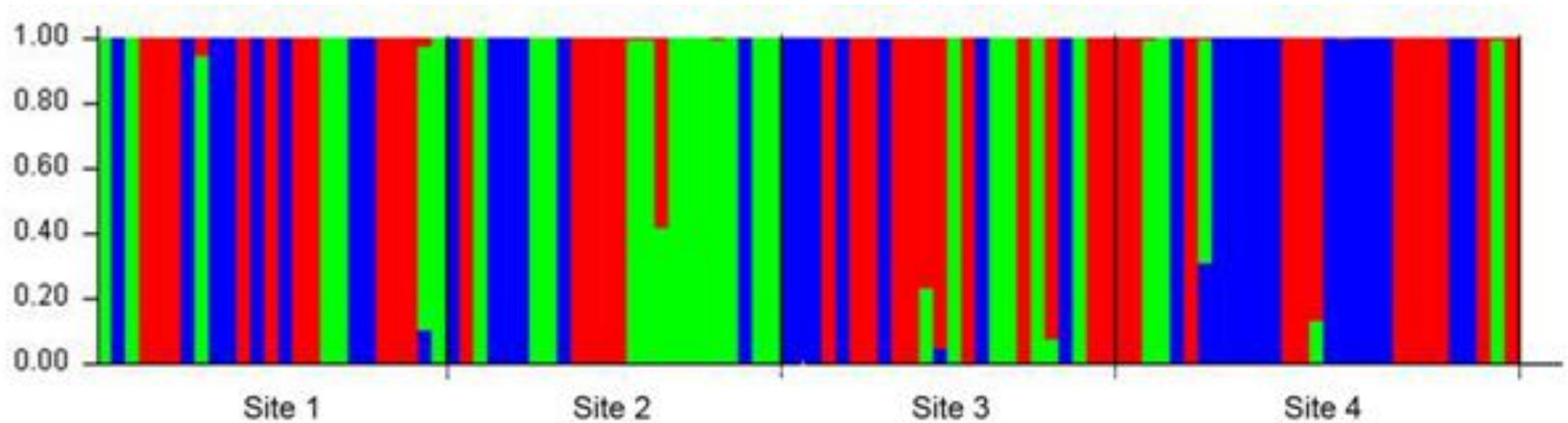
Тест Мантеля свидетельствует об отсутствии корреляции между генетическими и географическими дистанциями между исследованными группами особей, а также между генетическими дистанциями и уровнями поллютантов в почвах.

Дискриминантный анализ главных компонент (DAPC)

Группы сформированы программой по принципу наибольшего различия



Генетическая структура исследованных групп *A. caliginosa*, полученная с помощью программы Structure



Отсутствии движущего отбора



Отсутствие одного (или группы) наследуемого признака, отбор по которому приводил бы к увеличению жизнеспособности в условиях загрязнения



Многокомпонентность загрязнения

«-»

Медленная
миграция

«+»

пространственная
неоднородность
загрязнения

«-»

Не повышен
уровень
повреждений ДНК

↑
Эффект
экологической
воронки
(ecological sink)

↑
Дизруптивный
отбор

↑
Усиление
мутационного
процесса

Генетическое разнообразие популяции

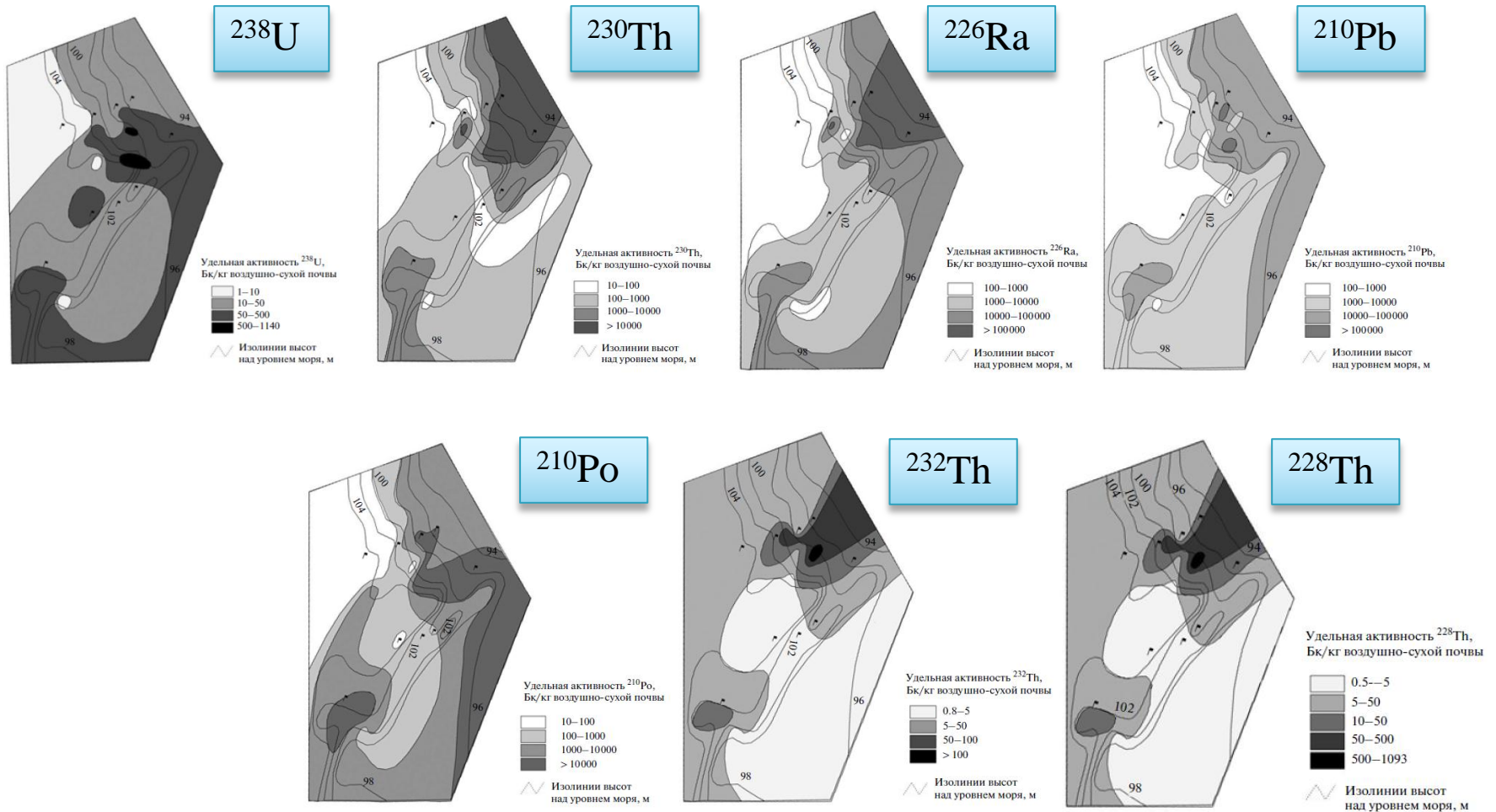
↓
Генетическая
эрозия

«+»
численность
снижена

↓
Движущий и
стабилизирующий
отбор

«-»
Нет расхождения
между популяциями
участков

Пространственная неоднородность загрязнения радионуклидами



Евсеева Т.И., Белых Е.С., Майстренко Т.А., С. А. Гераськин С.А., Таскаев А.И., Вахрушева О.М., Латеральное распределение радионуклидов уранового и ториевого рядов в антропогенно измененных почвах на территории складирования отходов радиевого производства // Радиационная биология. Радиоэкология, 2012. Т.52. №1. С.103-112.

Выводы

- ▶ Плотность населения дождевых червей значительно снижена в почвах участка 4 характеризующегося высоким содержанием радионуклидов и тяжёлых металлов
- ▶ Особи *A. caliginosa*, населяющие загрязнённые почвы не обладают повышенной устойчивостью к дополнительному острому воздействию γ -излучения в высоких дозах, а также более чувствительны к острому токсическому воздействию кадмия в высоких концентрациях

Выводы

- ▶ Уровни повреждения ДНК в целоомоцитах червей *A. caliginosa* и *L. rubellus*, населяющих загрязнённую и не загрязнённую почвы не различаются
- ▶ Скорость репарации повреждений ДНК в целоомоцитах *A. caliginosa* населяющих загрязнённые почвы выше, чем у червей с контрольного участка

Выводы

- ▶ Генетическое разнообразие особей внутри групп, населяющих участки 1–4, с разным уровнем загрязнения почв, не различается.
- ▶ Корреляция между генетическими и географическими дистанциями между исследованными группами особей отсутствует, как и между генетическими дистанциями и уровнями поллютантов в почвах.

Выводы

- ▶ Обнаружена сложная внутривидовая структура *A. caliginosa*, содержащая как минимум 3 генетически обособленных кластера, представленных в почвах всех экспериментальных участков

Вытекающее предположение

- ▶ Высокий уровень пространственной неоднородности и многокомпонентности антропогенного загрязнения делают почти невозможным движущий отбор и быструю адаптацию живых существ к меняющимся условиям, в тоже время, способствуют сохранению генетического разнообразия при снижении численности.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

