

ИГОНИНА

Елена Викторовна

**ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА В ХРОНИЧЕСКИ
ОБЛУЧАЕМЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *PINUS SYLVESTRIS L.* (СОСНА
ОБЫКНОВЕННАЯ), ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЗОНЕ АВАРИИ НА
ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АТОМНОЙ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ**

Специальность 03.01.01 - радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

**Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской Академии Наук
Институте общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

Научные руководители:

Доктор биологических наук **Кальченко В.А.**

Доктор биологических наук **Рубанович А.В.**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук **Гераськин С.А.**

Доктор биологических наук **Осипов А.Н.**

Ведущая организация:

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН.

Защита состоится «07» октября 2010 г. в 15.30 на заседании
диссертационного совета Д 501.001.65 в Московском государственном
университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119899, Москва, Ленинские
горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики, Новая ауд.

Отзывы просим направлять по адресу: 119991, г. Москва, МГУ,
Биологический факультет, Веселовой Т.В.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического
факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «___» сентября 2010 г.

Учёный секретарь диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Веселова Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время проблема последствий радиационного воздействия на природные популяции получила особую актуальность. В связи с перспективой истощения запасов углеводородов мир стоит на пороге «атомного ренессанса». Правительство РФ в 2008 г. приняло программу развития атомной энергетики, которая предусматривает строительство 26 новых энергоблоков к 2030 г. Опыт радиационных аварий, без сомнения, будет учтён при создании новых более безопасных технологий в ядерной энергетике. Однако практика показывает, что все стадии ядерного топливного цикла, начиная от переработки сырья и заканчивая утилизацией отработанного ядерного топлива, могут стать источником радиационного загрязнения окружающей среды.

Возрастание частоты мутаций под воздействием ионизирующих излучений показано во многих экспериментах. Однако накопление и элиминация генетических нарушений у организмов, существующих в реальных экологических условиях, происходят иначе, чем при облучении в условиях *in vivo*. Поэтому особую практическую и теоретическую ценность имеют результаты изучения динамики мутационного процесса в природных популяциях.

Сотрудники Лаборатории Экологической генетики, начали работу по сбору материала в зоне ЧАЭС летом 1986 г. В результате их исследований в семенах первой послеаварийной репродукции был выявлен высокий уровень цитогенетических повреждений и генных мутаций (Кальченко и др., 1993; Шевченко и др., 1996). Представляемая диссертационная работа является продолжением этих исследований.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы является изучение влияния ионизирующих излучений на динамику мутационного процесса в хронически облучаемых популяциях сосны.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Определить динамику возникновения и элиминации цитогенетических эффектов хронического облучения в популяциях сосен, получивших различную степень радиационных повреждений.
- 2) Провести исследование мутационного процесса у представителей облучённых популяций на молекулярно-генетическом уровне.
- 3) Изучить изменение радиочувствительности черномыльских популяций сосны.
- 4) Выявить проявление отдалённых последствий радиационного воздействия в репродуктивной и вегетативной сфере облучённых растений и их потомства.

Положения, выносимые на защиту:

1. В проростках семян от облучённых сосен *Pinus sylvestris* L. сохранялся повышенный уровень хромосомных aberrаций на протяжении не менее 15 лет после аварии на ЧАЭС.

2. У потомков второго поколения облучённых сосен не происходит накопления генных мутаций и цитогенетических нарушений, но наблюдаются многочисленные морфологические аномалии, спектр которых совпадает с основными типами радиоморфозов.

Научная новизна

Цитогенетические исследования были начаты сотрудниками Лаборатории экологической генетики в первый год после аварии, что позволило проследить динамику радиационных повреждений на в двух поколениях сосны обыкновенной.

Впервые изучена динамика радиобиологических и цитогенетических эффектов в семенном потомстве сосны, произрастающей в зонах сублетального, сильного, среднего и слабого радиационного повреждения в зоне аварии на ЧАЭС.

Впервые была изучена радиочувствительность проростков сосны из хронически облучаемых популяций зоны аварии на ЧАЭС.

Впервые был проведён анализ морфометрических характеристик второго поколения облучённых сосен.

Теоретическая и практическая значимость. В представленной работе выявлена высокая способность популяций сосны к восстановлению, проявляющаяся, прежде всего в уменьшении до контрольного уровня радиоиндуцированных цитогенетических и генетических нарушений. Полученные данные позволят оптимизировать затраты на ликвидацию последствий возможных радиационных аварий и инцидентов.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены на международном симпозиуме «Хроническое радиационное воздействие: возможности биологической индикации» (Челябинск, 1999 г.), международной конференции «Радиоактивность при ядерных взрывах и авариях» (Санкт-Петербург, 2000 г.), школе-конференции «Горизонты физико-химической биологии» (Пушкино, 2000 г.), международной конференции «Проблемы радиационной генетики на рубеже веков» (Москва, 2000 г.), международной конференции «Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций» (Москва, 2002 г.), международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды» (Сыктывкар, 2006), 35-ом съезде общества «European Radiation Research» (Киев, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, трёх глав и выводов. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц, 12 рисунков и 14 приложений. Список литературы содержит 147 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В качестве объекта для нашего исследования сосна была выбрана по нескольким причинам. Во первых, по радиочувствительности она близка к млекопитающим и человеку (Sparrow, Woodwell, 1963; Карабань и др., 1980). Во-вторых, от поколения макро- и микроспор до высывания семян проходит 18-24 мес. За это время в тканях семени и зародыша происходит накопление повреждений ДНК, которые затем реализуются в виде генных мутаций, aberrаций хромосом или гибели зародыша.

Сосна обыкновенная является хорошо изученным видом, ей посвящено большое число публикаций в радиобиологической литературе.

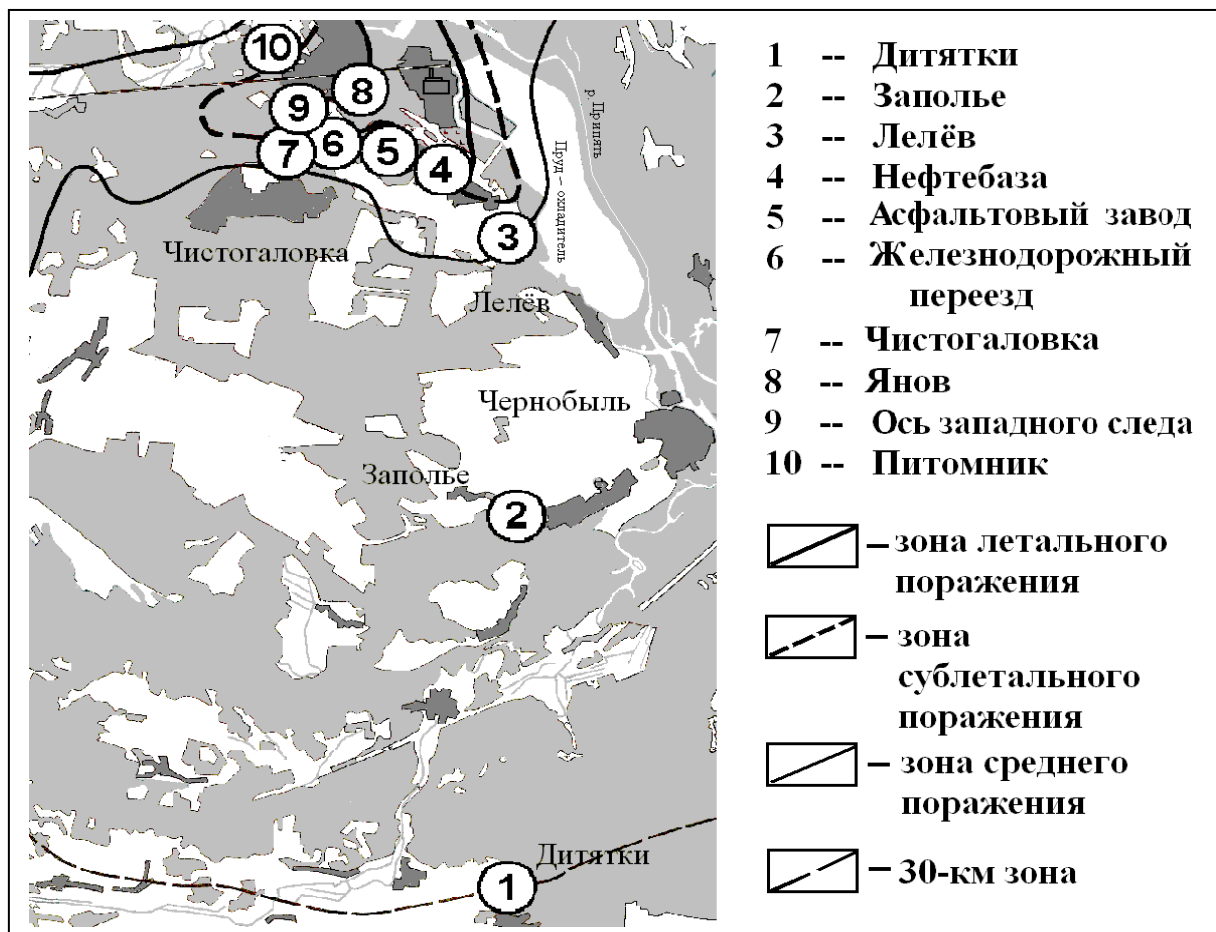


Рис. 1. Карта-схема изучаемых популяций сосны в 30-км Зоне ЧАЭС.

В зоне аварии на ЧАЭС сосна обыкновенная произрастает повсеместно в составе лесных сообществ, часто являясь лесообразующей породой. На сосняки в этом районе приходится 80% покрытой лесом территории (Кучма и др., 1994).

Выбранные популяции представляют весь спектр радиационных воздействий на сосновые леса сосны в пределах 30-км зоны (рис. 1, табл. 1). Поглощённые дозы на 1986 г. и степень радиационного поражения сосновых лесов определены в соответствии с картой-схемой, разработанной Козубовым с соавторами (Козубов, Таскаев и др. 1991). Измерение мощности дозы в 2004 г. проводили дозиметром 6150 AD4 (Германия) на высоте 1 м над уровнем почвы (табл. 1).

Четыре популяции находятся в районах посёлков Дитятки, Заполье, Лелёв, Копачи, Чистогаловка. Степень поражения сосновых насаждений — от заметной до средней, поглощённые дозы — от 0,5 до 5 Гр.

Таблица 1. Радиационная характеристика популяций сосны обыкновенной, произрастающих в зоне аварии на ЧАЭС.

Популяция	Поглощённая доза, (01.06.86) Гр	Степень радиационного поражения деревьев	Мощность дозы, мкЗв/час (23.12.04)
Дитятки	<0.5	Заметная	0,09
Заполье	0.5-1.0	Слабая	
Лелёв	4-5	Средняя	0,9
Чистогаловка	4-5	Средняя	5,7±1,3
Железнодорожный переезд	10-20	Сублетальная	6,3±0,7
Нефтебаза	10-20	Сублетальная	9±0,5
Асфальтовый завод	10-20	Сублетальная	18,3±0,8
Янов	80-100	Летальная	7,5±0,5
Ось западного следа	80-100	Летальная	26,3±0,7

С 1993 г. восстановили репродуктивную функцию деревья в зонах сублетального и летального поражения сосновых сосны. Здесь были выделены

популяции: Асфальтовый завод, Нефтебаза, Автостанция, Железнодорожный переезд. Поглощённые дозы здесь составляли 10-20 Гр. На территории бывшего Рыжего леса на расстоянии 1-2 км от ЧАЭС были найдены 3 выживших дерева, с которых в различные годы удавалось собрать семена. Здесь была выделена популяция Янов с уровнем дозы 80-100 Гр.

В 2004 г. был проведён сбор семян с деревьев 8-15 лет, выросших популяциях Дитятки, Чистоголовка, Нефтебаза, Железнодорожный переезд после аварии путём самосева. Были выделены новые популяции, состоящие из деревьев послеаварийной репродукции. Популяция Ось западного следа, расположена на расстоянии 4 км от ЧАЭС на западном следе радиоактивных выпадений, в 1986-1987 гг. сосновые насаждения на этом месте полностью погибли (поглощённые дозы — 80-100 Гр). В 2004 г. здесь была зафиксирована наибольшая мощность дозы γ -излучения (табл. 1). Молодые сосны в этой популяции представлены единичными угнетёнными экземплярами.

Изучение генетических последствий во втором поколении сосен, облучённых высокими дозами в первые месяцы после аварии, проводилось в питомнике, заложенном в 1987 году в районе р. Припять на незагрязнённой территории. К осени 1998 г. здесь собран первый урожай семян (популяция Питомник).

Для изучения радиобиологических эффектов во втором поколении облучённых сосен в 2005 г. в теплице Института общей генетики были выращены и высажены в подмосковном питомнике Горки Ленинские 1200 сеянцев.

Места сбора контрольных семян расположены в окрестностях пос. Успенское Московской области, а так же в экологически чистом районе Белгородской обл.

Для оценки индукции генетических нарушений, вызванных воздействием ионизирующих излучений, использовали частоту аббераций хромосом в клетках корневой меристемы проростков семян. Оценка

мутационного процесса с помощью цитогенетического анализа даёт результаты, сопоставимые с результатами, полученными методом электрофоретического анализа изоферментов. При возрастании частоты мутаций в изоферментных локусах в 17 раз, уровень клеток с абберациями хромосом возрастает в 7-8 раз (Кальченко и др., 1993). Цитогенетические эффекты оценивали по частоте дицентриков в клетках корневой меристемы проростков семян на стадии анафазы. Семена проращивали и фиксировали в год сбора. Стратификацию проводили в холодильнике при температуре +4°C в течение 10 суток, затем помещали в термостат для прорастания при температуре +27°C. Использовали проростки с длиной корня 7-8 мм. Именно на этом этапе роста в корне начинаются первые митозы (Васильев, 2002; Гераськин, Дикарев, 2008). Фиксацию ацетоалкоголем и окрашивание ацетокармином проводили по стандартной методике (Паушева, 1970; Пухальский и др., 2007).

Изучение мутационного процесса также проводили методом электрофоретического анализа изоферментов эндосперма семян. Эти изоферменты являются белковыми продуктами локусов *Gdh*, *Adh1*, *Adh2*, *Skdh1*, *Skdh2*, *Got2*, *Got3*. Мутации в соответствующих локусах приводят к изменению электрофоретической подвижности изоферментов. Эндосперм голосеменных растений или мегагаметофит является гаплоидным и происходит путём митоза из гаплоидной мегаспоры. Наличие у хвойных гаплоидной ткани эндосперма позволяет изучать процесс возникновения мутаций без контрольных скрещиваний (Кальченко, Спирин, 1989). Передача одного из двух аллелей эндосперму от гетерозиготного родителя происходит по менделевскому закону случайного распределения аллелей, вероятность передачи одного из аллелей составляет 50%. Отклонение от равновероятной передачи аллелей оценивали по показателю хи-квадрат.

Было отобрано 11 деревьев гетерозиготных по 7 перечисленным локусам (1-3 дерева с каждой популяции), изучено 942 эндосперма (60-130 для каждого дерева).

Были исследованы полиморфные белковые системы: алкогольдегидрогеназа (ADH), глутаматдегидрогеназа (GDH), шикиматдегидрогеназа (SKDH), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT). Электрофоретическое разделение ферментов проводилось в 12% - 18% полиакриламидном геле (ПААГ), в буферной системе трис-ЭДТА-борат, pH 8.3 (Peacock et. al., 1965). Семена для анализа замачивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, ставили в холодильник (+4⁰C) на 12 ч. после чего чашки выставляли на свет при комнатной температуре. Для электрофореза использовали проростки с корнем длиной около 1 мм. Эндосперм гомогенизировали индивидуально в 30 мкл раствора 0.05 М Трис-HCl (pH 8.0), 20% сахарозы, затем замораживали при -20⁰C в течение 40 мин. Последующие этапы электрофоретического анализа изоферментов проводили согласно методическому руководству (Concle et. al., 1982).

Экспериментальное облучение проростков производили на γ -установке ИОГена, мощность дозы источника γ -излучения ⁶⁰Co – 483 Р/мин. Облучение проводили в начальной стадии прорастания (длина проростка 1мм). Облучённые семена выдерживали при комнатной температуре и фиксировали через сутки.

Для оценки качества семенного потомства и состояния репродуктивных органов так же использовались биометрические показатели семенной продуктивности и интенсивности роста.

Статистическую обработку экспериментального материала проводили, используя методы биометрии и популяционной генетики (Калинина 1994; Рокицкий, 1961), а так же с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003, WinSTAT 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Цитогенетические эффекты. Многолетний мониторинг уровня цитогенетических нарушений в популяции сосны, подвергшейся острому и хроническому облучению в результате аварии на ЧАЭС, позволил выявить ряд

закономерностей возникновения и элиминации данного типа генетических повреждений.

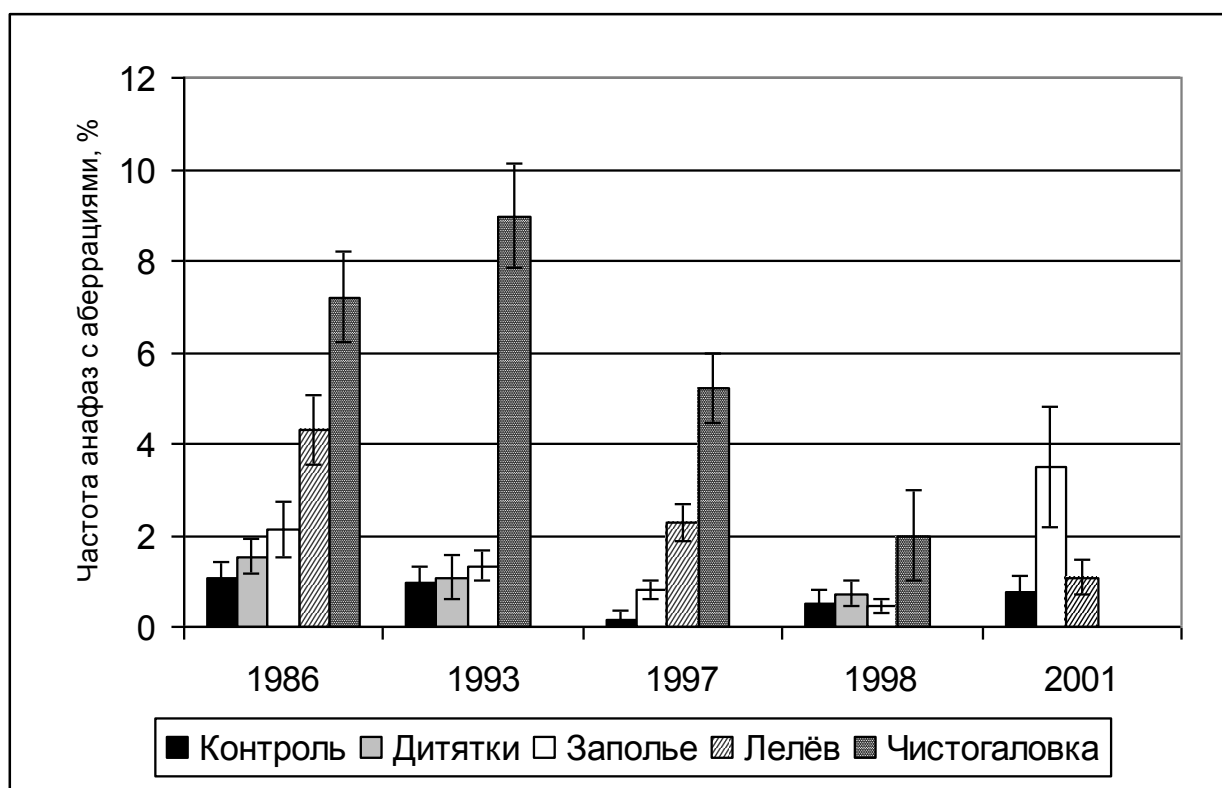


Рис. 2. Частота клеток с aberrациями хромосом в семенах сосны обыкновенной из популяций, произрастающих в зонах заметного, слабого и среднего поражения сосновых лесов.

Изучение частоты aberrаций хромосом в семенах сосны, произрастающие в 30-км зоне ЧАЭС, урожая 1986 г. выявило высокий уровень цитогенетических нарушений (рис. 2). В корневой меристеме семян деревьев из зоны средней степени поражения (поглощенная доза 4-5 Гр) количество клеток с aberrациями хромосом в 7 раз выше, чем в проростках контрольных семян (Кальченко, Рубанович и др., 1993; Шевченко и др., 1996).

В 1993 г. в популяциях с заметной и слабой степенью поражения деревьев (0,5-1 Гр) количество цитогенетических нарушений приблизилось к контрольному уровню, а в популяциях со средней степенью поражения деревьев (4-5 Гр) частота aberrаций хромосом оставались на уровне первых двух лет после аварии и превышали контрольные значения в 8 раз (рис. 2).

Через 11 лет после аварии (в 1997 г.) в популяциях с заметной и слабой степенью поражения деревьев (поглощенная доза 0,5-1 Гр) частота цитогенетических нарушений приблизилась к контролю, а в популяциях со средней степенью поражения (4-5 Гр) превышала контрольный уровень в 5 раз.

В 1998 г. в проростках семян обследуемых насаждений сосны наблюдали снижение количества клеток с абберациями хромосом во всех популяциях. В популяциях, расположенных в зоне заметного поражения количество клеток с абберациями хромосом снизилось до контрольных значений. В популяциях в зоне среднего поражения, уровень цитогенетических эффектов в проростках семян превосходил контрольные значения в 2 раза.

В семенах 2004 г. цитогенетические показатели в зоне среднего поражения находились на уровне контроля, а в зоне слабого поражения в популяции Заполье наблюдалось достоверное повышение контрольного уровня.

Результаты анализов цитогенетических эффектов в проростках семян деревьев сосны из зоны сублетального поражения, которые в результате облучения в 1986 г. на 5-7 лет задержали плодоношение, представлены на рис. 3. Из этих данных видно, что в 1993 г. в этих насаждениях уровни цитогенетических эффектов не превышали 3% и превосходили контрольные значения в 2-3 раза. После длительной задержки плодоношения в проростках семян деревьев сосны из этих зон (10-20 Гр) частота анафаз с абберациями достоверно превышает контрольный уровень. Однако, количество цитогенетических нарушений здесь ниже, чем в проростках семян популяций, облучённых более низкими дозами (рис. 2, 3).

Через лет после аварии 11 (в 1997 г.) в популяциях с сублетальной степенью поражения (10-20 Гр) частота клеток с абберациями хромосом превышала контрольный уровень в 1,5-5 раз, а в Янове (80-100 Гр) — 6,5 раз, что примерно соответствует частоте аббераций хромосом, наблюдаемой в первый год после аварии.

В проростках семян, собранных в 1998 г. эти значения снизились в двух популяциях до контрольных значений, а популяции Железнодорожный переезд превосходили контрольное значение только в 3 раза (рис. 3).

Наличие второго максимума aberrаций хромосом после 1986 года можно связать с усилением перехода радионуклидов в растения в середине 90-х годов (Тихомиров, 1997; Ипатьев, 1999; Переволоцкий, 2007).

Повышенный уровень частоты aberrаций хромосом в Заполье в 2001 году не позволяют нам сделать заключение о полном возвращении популяции сосны к контрольным значениям по этому показателю в отдалённый период после аварии.

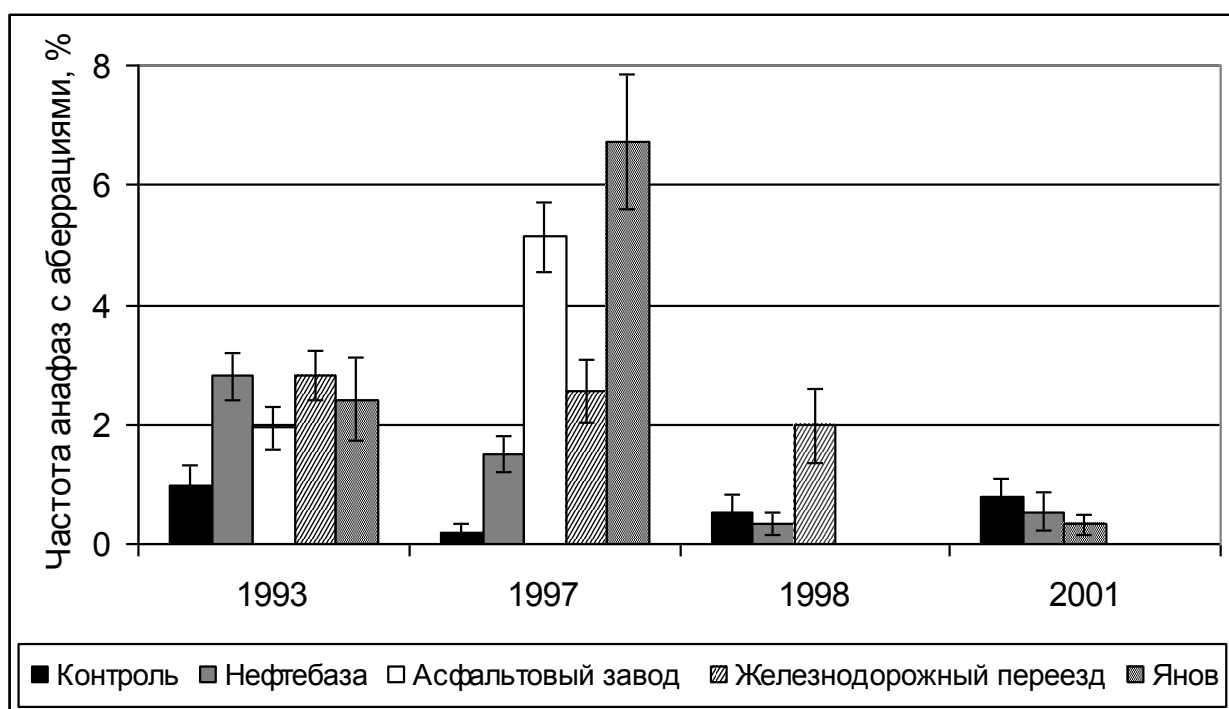


Рис. 3. Частота клеток с aberrациями хромосом в семенах сосны из популяций, произрастающих в зонах сублетального и летального поражения сосновых лесов.

Максимум частоты aberrаций в популяциях из зоны сублетального и летального поражения приходится на 1997 г. Цитогенетические эффекты в 1993 г., когда предположительно должна была произойти реализация накопленных за период радиационного поражения повреждений хромосом, оказались низкими в популяциях Асфальтовый завод и Янов.

2. Цитогенетические эффекты в семенах первого поколения облучённых сосен. В семенах растений первого послеаварийного поколения через 18 лет после аварии (2004 г.) частота клеток с абберациями хромосом во всех популяциях не отличалась от контроля (рис. 4). Онтогенез зародышей в семенах, собранных в 2004 г. в 30-км зоне ЧАЭС, в большинстве случаев происходил в условиях повышенного радиационного фона (табл. 1). Однако, мощности доз в 30-км зоне ЧАЭС в 2004 г. (до 170-кратного превышения естественного радиационного фона) сопоставимы с теми, которые наблюдались в популяциях Заполье и Дитятки в июне 1986 г (данные И. С. Федотова). Существующие в настоящее время мощности доз не оказывают влияния на уровень цитогенетических нарушений в соматических клетках проростков (рис. 4). Возможно, что современные мощности дозы не приводят к возрастанию частоты хромосомных аббераций в клетках корневой меристемы проростков.

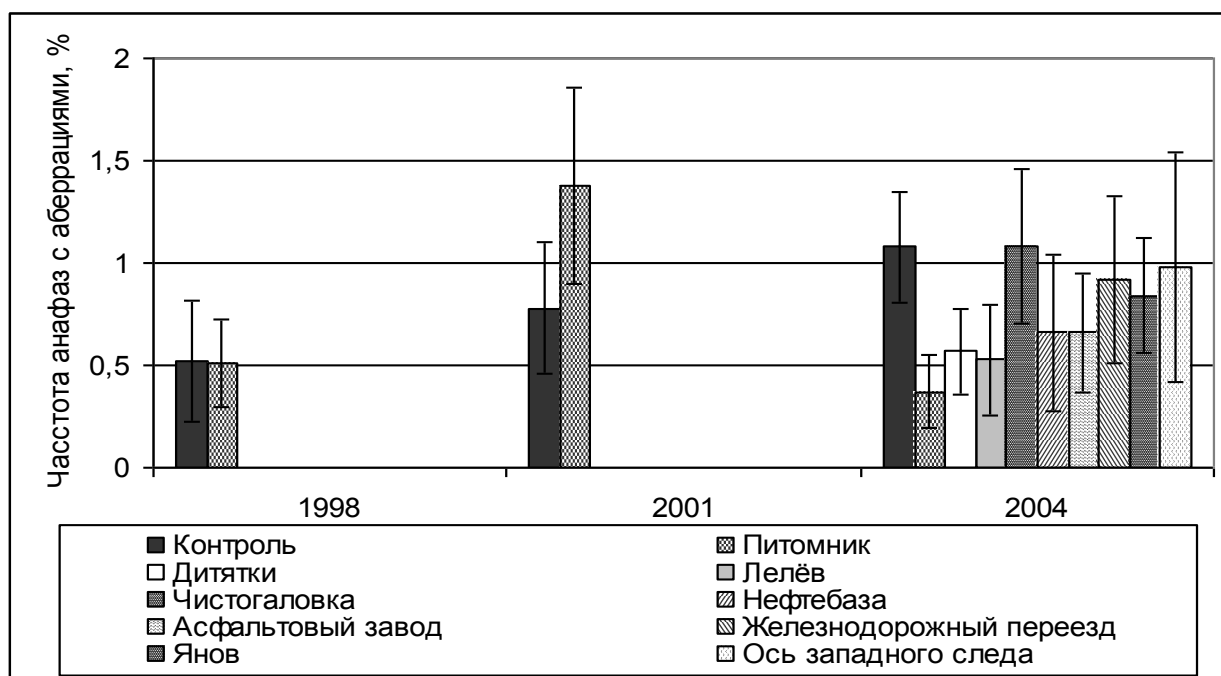


Рис. 4. Частота клеток с абберациями хромосом в проростках семян сосны первого послеаварийного поколения урожая 2004 г.

Из наших данных можно сделать заключение об отсутствии накопления цитогенетических нарушений в соматических клетках при 18-ти летнем произрастании двух поколений растений в условиях хронического облучения.

Цитогенетические эффекты также отсутствовали и в варианте Питомник, где в условиях ЕРФ выращивали потомков растений, получивших в 1986 г. высокие дозы облучения. Тенденция к превышению контрольного уровня в этой популяции была выявлена в семенах урожая 2001 г.

3. Радиочувствительность черномыльских популяций сосны. Чтобы оценить дозовую нагрузку, вызвавшую описанные нами цитогенетические эффекты и выявить вклад радиоадаптации в процесс снижения частоты аберраций хромосом, был поставлен опыт по острому облучению семян сосны из популяций, произрастающих в зоне ЧАЭС от γ -источника (^{60}Co).

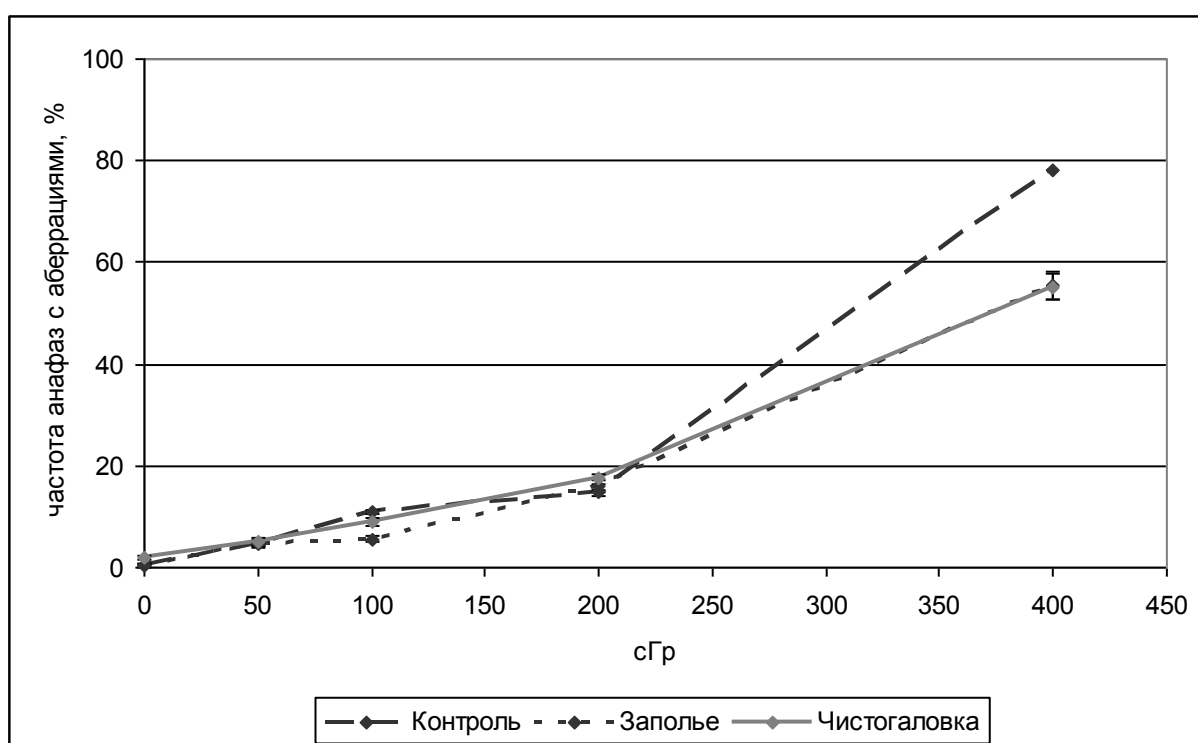


Рис. 5. Частота клеток с аберрациями хромосом в корневой меристеме проростков семян черномыльских популяций сосны при остром облучении.

Облучение семян контрольной популяции дозами от 600 до 2000 сГр вызывало появление клеток с множественными абберациями при частоте анафаз с перестройками от 89 до 100%. При облучении дозой 1500 и 2000 сГр митозы были единичными, и наблюдалась фрагментация хромосом.

Для построения дозовой зависимости были выбраны дозы 50, 100, 200 и 400 сГр.

На графиках выделяются два участка с разной величиной наклона кривой (рис. 5). На отрезке от фоновых значений до 200 сГр частота хромосомных аббераций возросла до 14-17%. В диапазоне от 200 до 400 сГр — до 55-78%. Это свидетельствует о нелинейном характере зависимости частоты цитогенетических эффектов от дозы облучения.

После объединения данных методом взвешенного среднего был получена функция в 1-й степени, описывающая зависимость доза-эффект для сосны обыкновенной при мощности дозы (483 Р/мин). В результирующую функцию не вошла точка «400 сГр», где результат не был статистически достоверен.

По совокупности данных для двух хронически облучаемых популяций и одной контрольной зависимость частоты клеток с абберациями в диапазоне доз от 0 до 200 сГр описывается линейной моделью вида:

$$y = 0,01 + 0,0007x, \quad (1)$$

где x – доза облучения (сГр), y – доля клеток с абберациями хромосом (от 0 до 1).

Величина удваивающей дозы при остром облучении данной мощности, определённая с помощью полученного линейного уравнения, составляет 15,8 сГр, что соответствует представлению о высокой радиочувствительности сосны. Данная величина близка к удваивающей дозе для человека, которая оценивается в 10 сГр (Дубинин, 1961).

4. Генетические эффекты во втором поколении облучённых сосен.

Нами было проведено 2500 локус-тестов подвижности изоферментов белков. В

семенах гетерозиготных деревьев урожая 2004 г. как в опытной, так и в контрольной популяциях, не было найдено ни одного случая изменения электрофоретической подвижности белков эндосперма, которые можно было бы оценивать как мутационное событие.

Электрофоретический анализ изоферментов белков в зоне аварии на ЧАЭС выявил в семенах урожая 1986 и 1987 гг. возрастание частоты мутаций изоферментных локусов с увеличением поглощённой дозы. В Дитятках этот показатель составлял $2,4 \cdot 10^{-3}$, в Заполье $3,3 \cdot 10^{-3}$, в Лелёве $5,1 \cdot 10^{-3}$, а в Чистогаловке $9,8 \cdot 10^{-3}$ мутаций на локус по сравнению с $0,6 \cdot 10^{-3}$ в контроле (Кальченко, Федотов, 2001).

Электрофоретический анализ изоферментов выявил в семенах урожая 2004г нарушение равновероятного распределения аллелей по 5 из 7 полиморфных локусов. В большинстве случаев нарушения сегрегации наблюдался сдвиг равновесия в сторону медленного аллеля. В контроле отклонений от равновероятного распределения аллелей выявлено не было (табл. 2). В популяциях Заполье, Лелёв, Припять, Чистогаловка в семенах урожая 1986-1988гг нарушения сегрегации встречались в среднем у 50% обследованных гетерозиготных генотипов. В контроле и дитятках случаев нарушения сегрегации не обнаружено. (Рубанович, Кальченко, 1994; Кальченко, Федотов, 2001).

В фоновых условиях в распределении локусов примерно у 5-10% гетерозиготных деревьев, наблюдается отклонение от равновероятного распределения аллелей (Белоконь и др., 1995; Dvornyk, 2001).

Среднее значение хи-квадрат на локус в семенах сбора 2004 г. составило 3,47 в чернобыльской популяции и 0,82 в контроле (табл. 2). В этой же популяции в семенах урожая 1986-1988 гг. среднее значение хи-квадрат было максимальным среди всех аналогичных исследований – 9,56 (0,54 в контроле) (Рубанович, Кальченко, 1994).

Таблица 2. Распределение аллелей изоферментов в эндосперме семян гетерозиготных деревьев сосны, произрастающих в 30-км зоне ЧАЭС.

Локус	Популяция	Число		Аллельная комбинация	Наблюдаемое распределение	χ^2
		деревьев	семян			
<i>Adh1</i>	Контроль	1	67	112 / 100	29:38	1,21
	Нефтебаза	2	102	112 / 100	51:51	0
	Железнодорожный переезд	1	121	112 / 100	63:58	0,21
<i>Adh2</i>	Нефтебаза	2	142	120 / 100	33:109	40,68*
	Чистогаловка	1	50	120 / 100	29:21	1,28
	Янов	2	118	100 / 27	54:46	0,85
<i>Gdh</i>	Питомник	1	70	121 / 100	44:26	4,63*
	Нефтебаза	2	260	121 / 100	118:142	2,22
	Железнодорожный переезд	1	116	121 / 100	54:62	0,55
	Чистогаловка	2	149	121 / 100	71:78	0,33
	Янов	2	135	121 / 100	61:74	1,25
	Ось западного следа	1	61	121 / 100	33:28	0,41
<i>Got2</i>	Контроль	1	63	122 / 100	31:32	0,02
	Питомник	1	37	122 / 100	11:26	6,08*
	Нефтебаза	1	55	128 / 122	20:35	4,09*
	Чистогаловка	2	144	122 / 100	74:70	0,11
	Янов	1	66	122 / 100	37:29	0,97
<i>Got3</i>	Контроль	1	58	350 / 100	33:25	1,10
	Нефтебаза	1	50	350 / 100	29:21	1,28
	Чистогаловка	2	135	350 / 100	70:65	0,19
	Янов	3	189	350 / 100	87:102	1,19
	Ось западного следа	1	61	350 / 100	32:29	0,15
<i>Skdh1</i>	Чистогаловка	1	74	107 / 100	35:39	0,22
	Янов	1	41	112 / 107	13:28	5,49*
	Ось западного следа	1	61	107 / 100	35:26	1,33
<i>Skdh2</i>	Контроль	1	38	115 / 106	16:22	0,95
	Янов	1	38	115 / 106	8:30	12,74*
	Янов	1	49	106 / 100	35:14	9,00*

*-достоверное отклонение сегрегации от 1:1 по критерию хи-квадрат ($p < 0,05$).

Выявленная в семенах второго поколения облучённых сосен тенденция к возрастанию нарушений равновероятного наследования аллелей связана с радиационным воздействием в результате аварии.

5. Влияние хронического облучения на семенную продуктивность и генеративные органы сосны обыкновенной.

Репродуктивные характеристики являются важным показателем жизнеспособности растений, влияющими на стабильность численности и структуру популяции.

Таблица 3. Количество выполненных семян в шишке в популяциях сосны, произрастающих в 30-км зоне ЧАЭС.

	1997	1998	2001	2004
Контроль	24,86±8,09	18,92±10,00	12,48±2,93	23,7±4,98
Питомник	16,49±2,67	19,27±8,37	15,50±3,26	14,68±3,85*
Дитятки		10,72±5,25	5,53±13,82	12,35±6,65
Заполье	15,90±7,63	10,47±6,96	7,97±3,96	
Лелёв	14,19±49,00		14,48±7,45	14,44±3,44*
Чистогаловка	12,09±8,84	8,89±2,77	12,86±3,38	23,78±6,01
Железнодорожный переезд	10,28±14,10	5,1±5,81		15,95±3,20
Асфальтовый завод	8,87±4,25	8,03±20,91		10,94±3,66*
Нефтебаза	15,46±8,07	9,72±5,57	12,68±6,23	10,15±7,95*
Янов	3,21±38,21		8,43	20,22±6,55
Ось западного следа				7,87±6,44*

*отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$.

Количество выполненных семян в шишке можно назвать основной репродуктивной характеристикой, так как он в совокупности с числом шишек, отражает репродуктивную способность дерева. Количество выполненных семян зависит от длины шишки, количества неразвитых и невыполненных семян.

Число выполненных семян в чернобыльских популяциях в 1997 г. было ниже уровня контроля в 1,5-8 раз. В последующие годы этот показатель семенной продуктивности в некоторых популяциях снижался в 1,5-3 раза по сравнению с контролем (табл. 3).

Значимая корреляция между количеством выполненных семян в шишке и поглощённой дозой наблюдалась в 1997 ($r=-0,67$) и 1998 ($r=-0,77$) годах.

В семенах урожая 2004 г. отличия от контроля достоверны в популяциях Питомник, Лелёв, Асфальтовый завод, Нефтебаза и Ось западного следа. Высокая изменчивость этого показателя в контроле не позволяет сделать вывод о снижении семенной продуктивности вследствие облучения.

5. Биометрические показатели вегетативной сферы. Выживаемость проростков из хронически облучаемых популяций в условиях закрытого грунта незначительно снизилась. В первый вегетационный период наибольший процент погибших растений наблюдался в контроле. К лету 2008 г. доля выживших растений в большинстве чернобыльских вариантов превышала контрольный показатель. В варианте «Питомник» различия с контролем достоверны ($p<0,05$).

Высота сеянцев на четвёртый год вегетации в открытом грунте достоверно не превышала контрольный уровень. Наблюдалась небольшая тенденция к возрастанию высоты с увеличением радиационного воздействия на растения первого поколения. В варианте «Янов» средняя длина стебля превышала контрольный уровень на 33%.

В результате двух лет наблюдения за сеянцами облучённых сосен, было выявлено увеличение частоты встречаемости растений с аномалиями развития хвои и побегов (рис 6). Учитывалась частота изменённых форм, происхождение которых связано с гибелью апикальной меристемы: нарушение апикального доминирования, второй прирост, 1-3 хвоинки в пучке. Механизм формирования трёххвойных пучков связан с гибелью верхушечной почки. Замещающие побеги, образовавшиеся из спящих почек в год повреждения, с

высокой частотой (до 90%) образуют брахиобласты с 3-мя хвоинками. Это вызвано изменением скорости пролиферации меристем, так как заложение зачатков хвои смещается на период наиболее интенсивного роста побегов (Чепик, 1982).

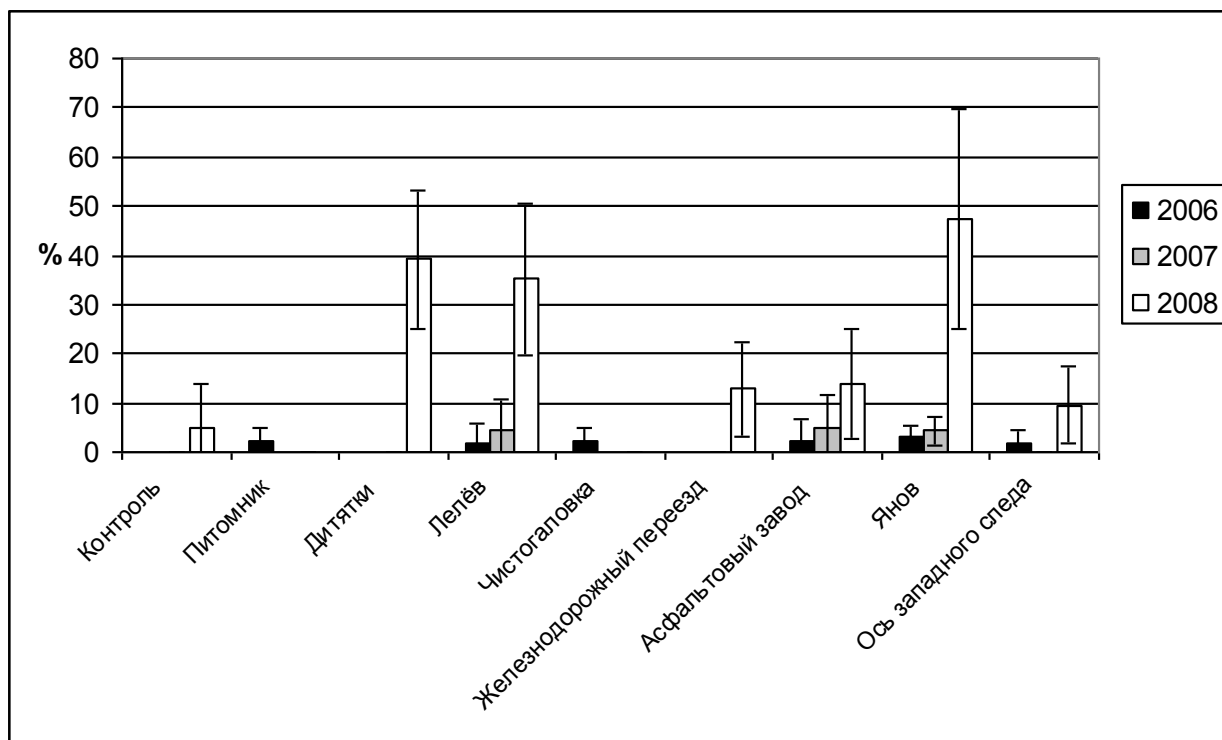


Рис. 6. Частота морфологических аномалий у растений второго поколения сосен, облучённых в результате аварии на ЧАЭС.

В 2006 г. частота семян с нарушениями апикального доминирования у потомков облучённых растений достигала 2%. В контроле такие изменения не найдены. В 2007 г. аномалии развития, связанные с повреждением апикальной меристемы в контроле отсутствовали, а у потомков облучаемых популяций их частота не превышала 5%. Летом 2008 г. наблюдалось резкое возрастание частоты аномалий роста и строения побегов. Достоверное превышение контрольного уровня было отмечено в популяциях Дитятки, Лелёв и Янов ($p < 0,05$). В популяции Янов частота таких аномалий составила 47%. Зависимости частоты морфологических аномалий от МЭД не выявлено (рис. 6).

Частота побегов с 1-3мя хвоинками у потомков первого поколения облучённых сосен, выросших на территории питомнике в г. Припять во второй год вегетации в 1988г. возрастала с 0,01% в зоне слабого поражения до 0,1%. Аномальный морфогенез сеянцев сосны в питомнике г. Припять наблюдался только во второй вегетационный период (Шевченко и др., 1996). Нашим растениям летом 2008 года исполнилось три года, но частота морфологических аномалий была очень высокой.

Возрастание частоты морфологических аномалий у сосны в зоне ЧАЭС наблюдалось в течение всего послеаварийного периода, как среди облучённых растений, так и у их потомков (Козубов, Таскаев, 1994; 2002). Бифуркации и фасциации стебля в настоящее время встречаются у 43-100% деревьев на территории Рыжего Леса, у 22% в окрестностях посёлков Копачи и Янов и у 6% в контрольных лесных массивах. Мощность дозы, вызывающая стопроцентную частоту морфологических аномалий побегов сосны, составляет 7 Гр/год (Йощенко, Бондарь, 2009).

Наши данные не позволяют установить прямую зависимость выживаемости, ростовых показателей и частоты морфологических аномалий от степени радиационного поражения родительских растений и мощности экспозиционной дозы. Однако можно сделать вывод, что частота морфозов у потомков облучённой популяции, возрастает на порядок, достигая значительной величины (47%). Этот эффект является отдалённым последствием облучения, проявляющемся во втором поколении облучённых растений. Поэтому нельзя говорить о полном восстановлении популяции от последствий радиационного воздействия. Если в 30-км зоне ЧАЭС возрастание частоты морфологических аномалий может быть вызвано повышенным радиационным фоном на месте произрастания деревьев, то в нашем случае имеет место трансгенерационная передача радиационных повреждений, так как растения выращены на незагрязнённой территории.

В целом результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что облучаемые популяции сосны проходят все стадии генетических изменений,

предсказанных на основании лабораторных экспериментов (Walles, 1956; Шевченко и др., 1976, 1985, 1992). Это возникновение мутаций, их элиминация, и переход популяции на более высокий уровень радиоустойчивости. Однако мутационный процесс в популяциях сосны обыкновенной имеет существенные особенности. Во первых, снижение частоты хромосомных мутаций, наблюдавшийся в 1990 г. не был окончательным. Главными факторами возникновения второй волны мутаций 1993г. стали процессы распределения радионуклидов между почвенными горизонтами и видоспецифические особенности корневой системы сосны. Во-вторых, стоит отметить тенденцию к снижению цитогенетических эффектов в популяциях с высокими уровнями радиационного воздействия. Среди потомства черномыльских популяций *Pinus sylvestris* L. не было найдено хлорофильных либо конститутивных мутантов. При этом, определённая в данной работе радиочувствительность сосны, является одной из самых высоких среди всех растений.

Выводы

1. Многолетний (1986-2004гг.) цитогенетический мониторинг популяций сосны обыкновенной, произрастающих в зоне аварии на ЧАЭС выявил два периода с высокой частотой возникновения мутаций (1986 и 1993-1997гг). После этих максимумов наблюдалось снижение количества цитогенетических нарушений до контрольного уровня. Очищение популяций от индуцированных мутаций происходило дважды: в 1990 и 2004 годах.

2. Анализ частоты генных мутаций в эндоспермах семян 2004 г. не выявил возрастания интенсивности мутационного процесса в изоферментных локусах *Gdh*, *Adh1*, *Adh2*, *Skdh1*, *Skdh2*, *Got2*, *Got3*. В то же время, в семенах деревьев из облучённых популяций наблюдаются случаи значимого отклонения от равновероятного распределения аллелей, что может быть проявлением отбора в хронически облучаемых популяциях.

3. Дополнительное острое γ -облучение семян сосны обыкновенной выявило возрастание радиоустойчивости растений из хронически облучаемых популяций на 20% по сравнению с контролем. Величина удваивающей дозы для сосны обыкновенной, определённая в результате этого эксперимента, оказалась очень низкой — 15,8 сГр, что очень близко к радиочувствительности млекопитающих и человека.

4. В период с 1997 по 2004 гг. количество жизнеспособных семян в некоторых черновыльских популяциях сосны было снижено в 1,5-8 раз. Однако высокая изменчивость этого показателя, как в контроле, так и в облучаемых популяциях, не позволяет сделать вывод об устойчивом снижении семенной продуктивности вследствие облучения.

5. Морфологический анализ второго поколения облучённых сосен выявил повышение частоты морфозов, связанных с нарушением апикального доминирования, в 5-10 раз по сравнению с контролем. Существенных изменений выживаемости и скорости роста у потомков облучённых сосен не выявлено. Высокую частоту морфологических аномалий во втором поколении можно считать главным отдалённым последствием воздействия ионизирующих излучений на популяции сосны в результате аварии на ЧАЭС.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Кальченко В. А., Федотов И. С., **Игоина** Е. В., Рубанович А. В., Шевченко В. А. Радиационно-генетический мониторинг популяций *Pinus sylvestris* L. зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // **Радиационная биология. Радиоэкология**. Т. 40, №5, 2000. С 607-615.

2. Kalchenko V. A., Fedotov I. S., Rubanovich A. V., **Igonina** E. V., Shevchenko V. A. Restoration of Pine Plantation After Exposure to Radiation in the Zone of the Accident at the Chernobyl Nuclear Power Plant. Междунар. конф. «Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций». Тез.

Докл. М.: Издательство Российского университета Дружбы народов. 2002. С. 277-283.

3. Shevchenko V. A., Kalchenko V. A., Abramov V. I., Rubanovich A. V., Kostina L. N., Fedotov I. S., **Igonina** E. V., Kusnetsova G. I. Cytogenetic Effects in Plant Populationn From the East Ural Radioactive Track. Труды междунар. конф. «Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций». Тез. Докл. М.: Издательство Российского университета Дружбы народов. 2002. С. 283-289.

4. Кальченко В. А., Абрамов В. И., Рубанович А. В., Костина Л. Н., Федотов И. С., **Иголина** Е. В., Кузнецова Г. И., В. А. Шевченко. Цитогенетические эффекты в популяциях растений, произрастающих на Восточно-Уральском радиационном следе // **Радиационная биология. Радиоэкология**. 2002. Т. 42. №6. С. 745-749.

5. Федотов И. С., Кальченко В. А., Рубанович А. В., **Иголина** Е. В., Шевченко В. А. Восстановление после воздействия ионизирующих излучений сосновых насаждений в зоне аварии на Чернобыльской АЭС // **Радиационная биология. Радиоэкология**. 2002. Т. 42. №6. С. 740-744.

6. И. С. Федотов, В. А. Кальченко Е. В. **Иголина**, А. В. Рубанович. Радиационно-генетические последствия облучения популяции сосны обыкновенной в зоне аварии на Чернобыльской АЭС. // **Радиационная биология. Радиоэкология**. Т. 46., №3, 2006. С. 268-278.

7. P. Dubrovina, E. **Igonina**, I. Fedotov. Remote Radiobiologic and Cytogenetic Effects in the Population of *Pinus Sylvestrys L.* from the Zone of Cernobyl NPP Accident. In abst.: European Radiation Research. 2006. Kyiv: «Чорнобилыінтерінформ». 2006. P. 188.

8. E. **Igonina**. Genetic Consequences of Radiation Exposure for the Pine (*Pinus sylvestris L.*) Population. Radioprotection 2008, Vol. 43, № 5. P 216.

9. Офицеров М. В., **Иголина** Е. В. Генетические последствия радиационного воздействия на популяцию сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris L.*) // **Генетика**. 2009. Т. 45. №2. С. 209-214.