

На правах рукописи

ВОЛКОВА Полина Юрьевна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ
ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО
РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

03.01.01 – Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Обнинск – 2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Обнинск

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Гераськин Станислав Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Гудков Игорь Николаевич, академик НААН Украины, доктор биологических наук, профессор, Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, заведующий кафедрой радиобиологии и радиоэкологии

Рубанович Александр Владимирович, доктор биологических наук, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, заведующий лабораторией экологической генетики

Ведущая организация: Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики Российской Академии Наук, г. Пущино

Защита состоится «__» декабря 2013 года в __ час. __ мин. на заседании диссертационного совета Д 006.068.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии по адресу: 249032, г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км, ГНУ ВНИИСХРАЭ Россельхозакадемии, к. 510.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИСХРАЭ Россельхозакадемии.

Отзывы на автореферат просим отправлять по адресу: 249032, г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км, ГНУ ВНИИСХРАЭ Россельхозакадемии, Диссертационный совет. Факс: (48439) 6-80-66.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Шубина Ольга Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Поступление радионуклидов в окружающую среду в результате деятельности человека – новый эволюционный фактор, создающий риск дополнительного радиационного воздействия на живые организмы и человека. Это обусловило необходимость анализа биологических эффектов ионизирующего излучения в популяциях растений и животных и изучения путей миграции радионуклидов в природных экосистемах. Радиоэкологические исследования показали, что лесные экосистемы играют важнейшую роль в перераспределении радионуклидов и отличаются высокой радиочувствительностью (Тихомиров, 1972; Sparrow, 1962; Woodwell, 1963). Результаты проведенных в последние десятилетия исследований показали прогрессирующее ухудшение состояния лесных экосистем (Падутов и др., 2008; Kozlov, Zvereva, 2007). Для разработки научно обоснованных мер по предотвращению дальнейшей деградации лесных фитоценозов необходимо изучение причин и механизмов их антропогенной трансформации.

Кроны лиственных и, особенно, хвойных деревьев, характеризуются высокой задерживающей способностью по отношению к поступающим из атмосферы поллютантам и медленным самоочищением от них. Поэтому долговременные наблюдения за популяциями хвойных растений, населяющими загрязненные в результате крупных радиационных аварий территории, могут стать источником ценной информации о закономерностях формирования биологических эффектов в этих условиях, а также направленности и динамике адаптивных процессов.

Способность популяции адаптироваться к меняющимся условиям среды зависит, в частности, от величины генетического полиморфизма признаков, по которым идет отбор (Bradshaw, 1991; Fisher, 1930). Хроническое стрессовое воздействие может менять величину и структуру внутривидовой изменчивости (Удалова, Гераськин, 2011; Шевченко и др., 1992; Vickam et al., 2000; Wurgler, Kramer, 1992). Поэтому анализ взаимосвязей генетического полиморфизма признаков и факторов внешней среды является перспективным с точки зрения разработки новых методов оценки состояния окружающей среды. Кроме того, он вносит существенный вклад в понимание генетических основ дивергенции и адаптации популяций животных и растений в современных условиях. Однако до настоящего времени остается открытым вопрос о том, какие генетические процессы происходят в популяциях растений и животных, населяющих территории с относительно низким уровнем радиоактивного загрязнения.

Результаты исследований влияния малых доз хронического облучения на состояние природных популяций лежат в основе разработки принципов и норм допустимого техногенного воздействия на природные экосистемы.

Цель и задачи работы. Целью исследования являлся анализ генетической дифференциации популяций сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) исследовать полиморфизм ферментов антиоксидантной системы в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной, оценить частоту и спектр мутационных событий;
- 2) оценить активность ферментов антиоксидантной системы в исследуемых популяциях;
- 3) исследовать взаимосвязь генетических характеристик популяций с поглощённой критическими органами растений дозой;
- 4) оценить генетические расстояния между исследуемыми популяциями.

Положения, выносимые на защиту.

1. В популяциях сосны обыкновенной, населяющих загрязнённые в результате аварии на Чернобыльской АЭС участки Брянской области (поглощённая доза составляет от 7 до 130 мГр/год), частота мутаций изоферментных локусов, эффективное число аллелей, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность возрастают вместе с увеличением поглощенной в репродуктивных органах сосны дозы.
2. В исследуемых популяциях сосны обыкновенной увеличено внутривидовое разнообразие и частота встречаемости редких морф. Генетическая дифференциация исследованных популяций обусловлена повышенной частотой встречаемости редких аллелей.
3. В исследованном диапазоне мощностей доз активность ключевых ферментов антиоксидантной системы не зависит от величины радиационного воздействия.

Предмет и объект исследования. Объектом исследования являются популяции сосны обыкновенной, произрастающие в радиоактивно загрязнённых районах Брянской области. Предметом исследования является оценка хронического радиационного воздействия на природные популяции растений.

Методологическая, теоретическая и эмпирическая база исследования. Методологической базой исследования являются методы анализа генетического полиморфизма и биохимического статуса живых систем. Теоретическая база исследования

основывается на современных радиобиологических концепциях немишенного действия ионизирующих излучений в малых дозах и принципах биохимической генетики. Эмпирической базой работы является комплексное исследование хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной с анализом зависимостей между накопленной дозой и биологическими эффектами в популяциях.

Научная новизна. Впервые исследован полиморфизм и оценена активность антиоксидантных ферментов у сосны обыкновенной из популяций, развивающихся в условиях хронического радиационного воздействия с низкой мощностью дозы (7-130 мГр/год).

Установлена достоверная связь частоты мутационных событий в изоферментных локусах с уровнем поглощённой генеративными органами растений дозы. Доказана радиационная природа наблюдаемых эффектов.

Показано, что хроническое радиационное воздействие в диапазоне мощностей доз 7-130 мГр/год можно рассматривать в качестве экологического фактора, способного менять генетическую структуру популяций сосны обыкновенной.

Установлено отсутствие значимого эффекта радиационного воздействия на активность ферментов антиоксидантной системы и отсутствие взаимосвязи между количеством мутационных событий и ферментативной активностью в исследуемых популяциях. Полученные в настоящей работе результаты вносят весомый вклад в решение вопроса о биологическом значении полиморфизма белков и развитие теоретической базы сохранения и рационального использования популяционных генофондов.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты могут быть использованы для совершенствования существующей системы контроля состояния окружающей среды. Дополнение традиционной системы экологического мониторинга методами биоиндикации с использованием высших растений повышает надежность оценок экологического риска. Анализ изоферментного полиморфизма может использоваться как информативный метод оценки состояния популяций растений в условиях хронического низкодозового воздействия.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 03.01.01 «Радиобиология», охватывающей проблемы последствий ядерных катастроф и радиозологии (п. 9), принципы и методы радиационного мониторинга (п. 10), отдалённые последствия действия излучений и хроническое действие радиации (п. 11), в диссертационном исследовании представлен анализ биологических эффектов

хронического низкодозового облучения природных растительных популяций, произрастающих в районах Брянской области, загрязнённых в результате аварии на Чернобыльской АЭС.

Личный вклад диссертанта в работу. Соискатель непосредственно участвовала в постановке цели и задач диссертационной работы, в создании экспериментальной базы исследования и проведении экспериментов. Экспериментальная биохимическая часть диссертации и статистическая обработка данных выполнена самостоятельно. Автор участвовала в пробоподготовке для γ -спектрометрического и радиохимического анализов, выполнявшихся в физико-химическом отделе ВНИИСХРАЭ. Диссертант принимала активное участие в интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций.

Апробация и реализация результатов диссертации. Основные результаты исследований были доложены на VI съезде по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, 2010), Российской научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии» (Санкт-Петербург, 2011), Региональных научных конференциях «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2011, 2013), Международной конференции «Чернобыль: опыт международного сотрудничества при ликвидации последствий аварии» (Обнинск, 2011), Международной научной конференции «Радиация и Чернобыль: наука и практика» (Гомель, 2011), 16-й и 17-й Международных школах-конференциях молодых учёных (Пушино, 2012, 2013), SETAC CEE Annual Meeting (Krakow, 2012), Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013), XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (Москва, 2013), 13-ой Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2013 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2013).

Результаты исследования были включены в отчёты при выполнении работ по следующим договорам и грантам: ФЦП «Ядерная и радиационная безопасность России» «Анализ подходов к радиационной защите объектов живой природы и агросферы» контракт № 5-18(359)-3-1802 с Фондом экологической безопасности энергетики; «Анализ механизмов адаптации популяций растений к техногенному загрязнению», 2008-2010 гг. – федеральный грант РФФИ 08-04-00631; «Изучение радиобиологических эффектов в популяциях сосны обыкновенной на подвергшейся радиационному загрязнению в результате аварии на ЧАЭС территории России», 2011 г. – региональный грант РФФИ 11-04-97524; Исследование

механизмов адаптации популяций растений к техногенному воздействию, 2011-2013 гг. – федеральный грант РФФИ 11-04-00670; Изучение эффектов радиационного воздействия на сельскохозяйственные растения и разработка научных основ экологического нормирования, 2011-2012 гг. – федеральный грант РФФИ, 11-08-00430; Изучение закономерностей формирования биологических эффектов в природных популяциях сосны обыкновенной на территории России в отдалённый период после Чернобыльской аварии, 2012-2013 гг. – региональный грант РФФИ, 12-04-97550.

По теме диссертации опубликовано **17** печатных работ, в том числе **2** статьи – в рецензируемых журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объём диссертации. Работа состоит из введения, 4 глав, выводов, списка использованной литературы, включающего 209 источников, из них 113 на иностранном языке. Диссертация изложена на 135 страницах, содержит 14 таблиц и 19 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность темы исследования, ставятся цель и задачи, решаемые в диссертации, обсуждается их научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

Глава I. Обзор литературы

На основе анализа отечественной и зарубежной литературы рассмотрены закономерности формирования радиобиологических эффектов у растений. Описаны методы анализа изоферментного полиморфизма в популяционно-генетических исследованиях и роль ферментов антиоксидантной системы в элиминации свободных радикалов. Отдельная глава обзора литературы посвящена оценке ферментативной активности спектрофотометрическим методом.

Глава II. Материалы и методы исследования

Исследование проводили на территории Брянской области в Новозыбковском, Клинцовском и Красногорском районах, характеризующихся наибольшими уровнями радиоактивного загрязнения в результате Чернобыльской аварии. Было выбрано 4 экспериментальных участка, контрастных по уровню радиоактивного загрязнения, и 1 контрольный. Мощность дозы на участках варьировала от 0,37 до 1,21 мкГр/час, по сравнению с 0,10 мкГр/час на контрольном участке.

Объектом исследования выбрали сосну обыкновенную (*Pinus sylvestris* L.). Хвойные деревья отличаются высокой радиочувствительностью (Sparrow, 1967). Помимо высокой

радиочувствительности, сосну обыкновенную отличает длительный генеративный цикл – от момента закладки репродуктивных органов до созревания семян проходит 2 года, что обеспечивает накопление достаточного числа мутационных событий даже при относительно невысоких дозах воздействия. Популяции сосны обыкновенной выбирались таким образом, чтобы обеспечить равномерный шаг по мощности экспозиционной дозы в местах их произрастания.

Для исследования техногенного загрязнения экспериментальных участков отбирали образцы почвы и биологического материала (шишек). В почвенных образцах определяли удельную активность ^{137}Cs , ^{40}K , ^{226}Ra и ^{232}Th методом γ -спектрометрии. В шишках определяли активность ^{137}Cs γ -спектрометрическим методом и ^{90}Sr радиохимическим методом. В почвах оценивали значение водородного показателя, содержание гумуса, минеральный состав, катионообменную способность и гидролитическую кислотность в соответствии со стандартом ISO 17025. В почвах и шишках фотометрическим методом измеряли концентрации Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Zn, Ni и Mn.

Для анализа изоферментного полиморфизма в экспериментальных популяциях выбрали три фермента антиоксидантной системы: супероксиддисмутазу (SOD), глутатионпероксидазу (GPX) и глутатионредуктазу (GR). Гомогенаты готовили из гаплоидных эндоспермов семян сосны обыкновенной, предварительно обескрыленных и очищенных. Анализ проводился в 7,5%-ном полиакриламидном геле на установках «PROTEAN II xi Cell» (США) и «Hoefer SE 600 Chroma» (Финляндия) с Tris-глициновым электродным буфером (рН 8,9). При анализе GPX и GR образцы с разных участков были предварительно зашифрованы и перемешаны. Гистохимическое окрашивание гелей проводили в соответствии с рекомендациями (Manchenko, 1994). После окрашивания зимограммы фотографировали для дальнейшего анализа.

Для определения ферментативной активности выбрали три ключевых фермента антиоксидантной системы – SOD, каталазу (CAT), пероксидазу (POD). Гомогенаты семян центрифугировали и сразу же анализировали с помощью бесцветного спектрофотометра NanoDrop-2000 (США), в соответствии с рекомендациями (Биссвангер, 2013).

Полученные результаты обработаны с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

Глава III. Результаты

3.1 Техногенное загрязнение экспериментальных участков. Физико-химические параметры почв экспериментальных участков типичны для Центрального региона России.

Почвенная рН низка во всех почвах, варьируя от 4,02 до 5,06. Содержание кадмия, меди, свинца, цинка, никеля и марганца в почвах ниже соответствующих допустимых концентраций химических веществ в почвах, принятых в России. Значимых различий экспериментальных участков с контрольным по физико-химическим свойствам почвы, а также содержанию тяжёлых металлов в образцах почв и шишках не обнаружено (Geras'kin et al., 2011).

Совершенно иная картина выявлена в отношении радиоактивного загрязнения. На всех экспериментальных участках активность радионуклидов в почве и шишках значимо превышает контрольный уровень (табл. 1).

Таблица 1 - Активность ^{137}Cs в почве и шишках и ^{90}Sr в шишках

Вариант	Средняя активность ^{137}Cs в 0-15 см слое почвы, Бк/кг	Активность ^{137}Cs в шишках, Бк/кг	Активность ^{90}Sr в шишках, Бк/кг
Контроль (К)	52,1	30,0±3,7	1,32±0,065
ВИУА	2436,0*	948±13*	16,79±1,93
Старые Бобовичи (СБ)	10212,7*	342±8*	20,81±1,31
Заборье Поле (ЗП)	36160,0*	1008±18*	64,25±2,20
Заборье Кладбище (ЗК)	56333,3*	3246±32*	83,0±2,19

* - отличие от контроля значимо ($p < 0.05$)

3.2 Оценка поглощённых доз в генеративных органах сосны обыкновенной. Для расчета дозовых нагрузок на генеративные органы деревьев сосны использовали специально разработанную дозиметрическую модель (Спиридонов и др., 2008; Geras'kin et al, 2011). Для расчета дозовых нагрузок, формируемых γ -излучением ^{137}Cs , лесная экосистема была разделена на 5 зон по вертикальному профилю. Для параметризации модели и оценки дозовых нагрузок на генеративные органы сосны были использованы данные по концентрациям радионуклидов в почве и шишках экспериментальных участков. На наиболее загрязнённом участке ЗК годовая мощность поглощённой дозы достигает 130 мГр/год (табл. 2). Основная часть поглощённой дозы в генеративных органах сосны формируется за счёт ^{137}Cs , содержащегося в верхнем 10-см слое почвы (Спиридонов и др., 2008).

Таблица 2 - Дозовые нагрузки на генеративные органы сосны

Участок	D_{γ} , мГр/год	D_{β} , мГр/год	$D_{\text{общ}}$, мГр/год
К	0,124	0,013	0,137
ВИУА	6,62	0,344	6,96*
СБ	22,7	0,156	22,9*
ЗП	90,2	1,20	91,4*
ЗК	129,4	0,506	129,9*

* - различие с контролем значимо ($p < 0.05$)

3.3 Электрофоретический анализ ферментов антиоксидантной системы. При изучении генетической изменчивости ферментов придерживались следующих обозначений:

- наиболее часто встречающийся аллель локуса обозначали 1.00;
- остальные аллели этого локуса обозначали в соответствии с их электрофоретической подвижностью относительно аллеля 1.00 (например, 1.10 – более быстрый, чем 1.00, аллель, а 0.95 – более медленный);
- варианты с отсутствием электрофоретической подвижности обозначали n (нуль-аллели).

В исследуемых популяциях сосны супероксиддисмутаза контролируется тремя различающимися по электрофоретической подвижности локусами. Локусы SOD-2 и SOD-3 мономорфны на всех исследуемых участках, локус SOD-1 на участках ЗК и ЗП представлен двумя аллелями. Кроме того, в некоторых пробах был зафиксирован локус SOD-4, но из-за плохого разрешения его не учитывали при анализе результатов. У глутатионредуктазы был идентифицирован один полиморфный локус, у глутатионпероксидазы – три, но для анализа были использованы два из них, обладающие наилучшим разрешением. При анализе в локусах GR и GPX-1 выявлено по два аллеля, а в локусе GPX-2 – три. На основании полученных данных была оценена частота каждого аллеля в контрольной и экспериментальных популяциях. Проведены свыше 12 000 локус-тестов. Показано (Волкова, Гераськин, 2013), что в условиях антропогенной нагрузки повышается частота редких аллелей и увеличивается дисперсия выборки.

Оценили показатель фенотипического разнообразия Животовского, связанный с количеством аллелей в выборках: т.е. там, где полиморфизм ферментов высок, количество аллелей тоже велико. Мономорфными оказались локусы SOD-2 и SOD-3 во всех популяциях, остальные локусы характеризуются средним уровнем изменчивости. Наиболее полиморфными являются популяции Заборье Поле и Заборье Кладбище. Индексы фенотипического разнообразия в экспериментальных популяциях значимо отличаются (рис. 1, $r=99\%$) от контроля. Таким образом, в условиях хронического облучения происходит увеличение среднего числа фенотипов в выборке, т.е. генетические процессы в исследуемых популяциях ведут к увеличению фенотипического разнообразия.

Для детализации аллозимной структуры популяций оценили долю редких морф. Из рис. 2 видно, что доля редких морф увеличивается вместе с уровнем радиоактивного загрязнения ($r=74\%$).

Оцененные по шести локусам трех ферментных систем величины наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности контрольной популяции близки к оценкам, полученным

ранее для других видов сосен (Крутовский и др., 1989). Качественно иная картина имеет место для наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности экспериментальных популяций, которые возрастают (рис. 3) вместе с уровнем радиоактивного загрязнения участков ($r=99\%$, $p<0.01$).

Для оценки аллельного разнообразия популяций можно учесть общее число разных аллелей, обнаруженных по данному локусу. Но более информативно их число не в абсолютном выражении, а с учетом частоты встречаемости: чем меньше частота аллеля, тем меньший вклад он вносит в аллельное разнообразие локуса. Одной из мер этого разнообразия является эффективное число аллелей n_e (Животовский, 1991).

Из табл. 3 ясно, что хроническое радиационное воздействие приводит к увеличению эффективного числа аллелей по сравнению с контролем. Это связано с тем, что в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной редкие аллели вносят больший вклад в аллельное разнообразие.

Таблица 3 - Эффективное число аллелей

Участок	Мощность дозы, мГр/год	Эффективное число аллелей
Контроль	0,137	$1,12 \pm 0,01$
ВИУА	6,96	$1,16^* \pm 0,01$
Старые Бобовичи	22,9	$1,25^{**} \pm 0,02$
Заборье Поле	91,4	$1,54^{**} \pm 0,08$
Заборье Кладбище	129,9	$1,61^{**} \pm 0,04$

* - отличие от контроля значимо на уровне $p<0.05$; ** - отличие от контроля значимо на уровне $p<0.01$

В эксперименте были зафиксированы нуль-мутации, для которых характерно полное прекращение биосинтеза белка. Значимое увеличение частоты нуль-мутаций наблюдалось (табл. 4) в популяциях с экспериментальных участков. Также в популяциях СБ, ЗК и ЗП значимо превышены частоты дупликаций и изменений электрофоретической подвижности. (табл. 4). Общая частота мутаций (рис. 4, $r=99\%$) значимо увеличивается вместе с ростом уровня радиоактивного загрязнения участков. Таким образом, хроническое радиационное воздействие в изученном диапазоне доз ведет к повышению частоты мутационных событий в популяциях сосны обыкновенной.

Кроме эндоспермов семян сосны обыкновенной, при работе с ферментом SOD анализировали зародыши с целью оценки давления отбора против редких электрофоретических вариантов белков. Было проведено 3240 локус-тестов, но достоверной элиминации редких электрофоретических вариантов фермента не обнаружено, хотя существует тенденция к снижению частоты мутаций на зимограммах зародышей (рис. 5)

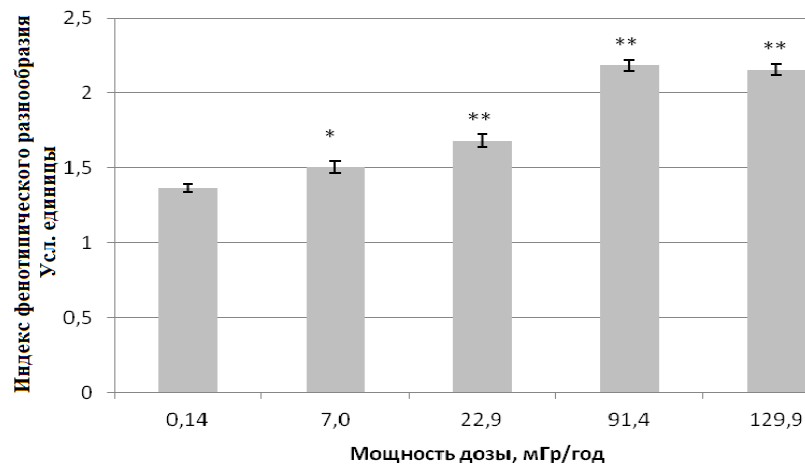


Рисунок 1 - Фенотипическое разнообразие популяций сосны обыкновенной по трём ферментам (* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, 8936 локус-тестов)

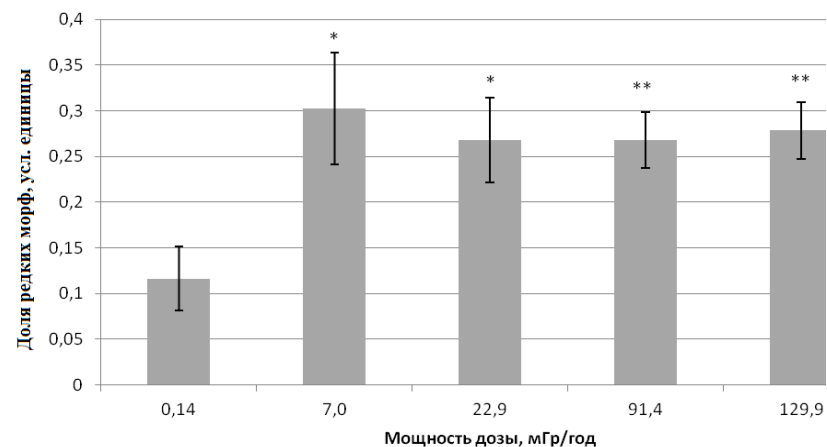


Рисунок 2 - Доля редких морф в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной (* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, 8936 локус-тестов)

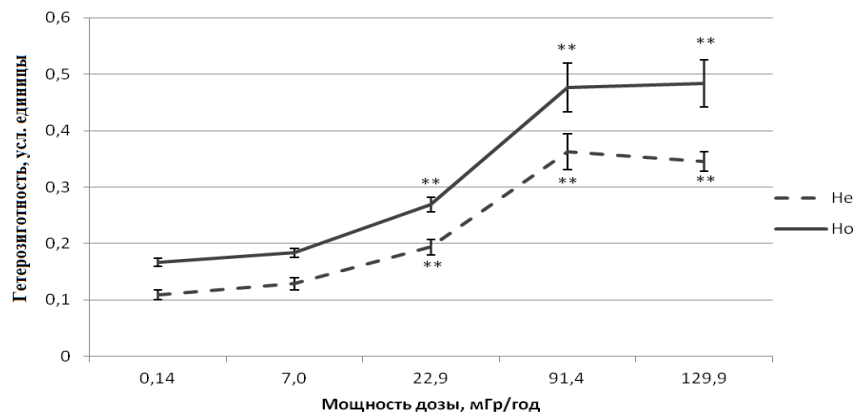


Рисунок 3 - Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности в экспериментальных популяциях (** - $p < 0.01$, 8936 локус-тестов)

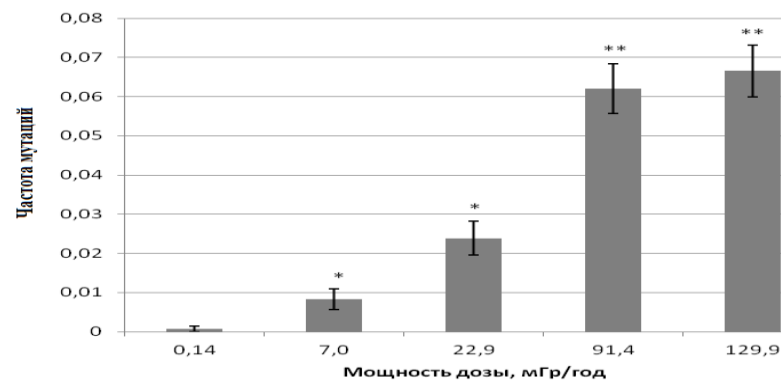


Рисунок 4 - Общая частота мутаций в эндоспермах семян сосны обыкновенной (* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, 8936 локус-теста)

Для оценки генетической дифференциации исследуемых популяций был проведен кластерный анализ с использованием в качестве меры генетического расстояния по Неи. По результатам анализа исследуемые популяции разделились (рис. 6) на две резко различающиеся уровнем радиоактивного загрязнения группы.

Таблица 4 - Частоты разных типов мутаций в эндоспермах семян

Участок	Число локус-тестов	Частота нуль-мутаций	Частота дупликаций	Частота изменений электрофоретической подвижности
К	1836	0,0007 ± 0,0007	0	0
ВИУА	1657	0,0066* ± 0,0023	0	0,0008 ± 0,0008
СБ	1603	0,0140** ± 0,0033	0,0049** ± 0,0020	0,0049* ± 0,0020
ЗП	1956	0,0384** ± 0,0051	0,0112** ± 0,0028	0,0098** ± 0,0026
ЗК	1884	0,0418** ± 0,0053	0,0163** ± 0,0034	0,0113** ± 0,0028

* - отличие от контроля значимо на уровне $p < 0.05$; ** - отличие от контроля значимо на уровне $p < 0.01$

3.4 Активность антиоксидантных ферментов. Данные по активности ферментов каталазы, супероксиддисмутазы, пероксидазы представлены на рис. 7. Значимое отличие от контроля демонстрирует каталаза на участке с мощностью дозы 22.9 мГр/год. Значимых изменений в активности супероксиддисмутазы не выявлено. Активность пероксидазы снижается по сравнению с контролем на наиболее загрязнённых участках. Супероксиддисмутаза характеризуется наименьшими значениями активности по сравнению с другими проанализированными ферментами.

Глава IV. Обсуждение

4.1 Техногенное загрязнение экспериментальных участков. Почвы всех экспериментальных участков схожи по физико-химическим свойствам. Содержание доступных растениям подвижных форм тяжёлых металлов в почвах экспериментальных участков ниже установленных допустимых пределов (Geras'kin et al., 2011).

Из всех радиоактивных продуктов деления и нуклидов с наведенной активностью, образующихся в ядерных реакциях, только для двух радионуклидов - ^{90}Sr и, в меньшей степени, для ^{137}Cs , почвенный путь поступления в растительность, в том числе и древесную, играет важную радиационно-гигиеническую и радиоэкологическую роли (Алексахин, 1977). Сосна по величине коэффициента перехода ^{90}Sr и ^{137}Cs из почвы в растение занимает третье место среди древесных пород после осины и березы (Тихомиров и др., 1973).

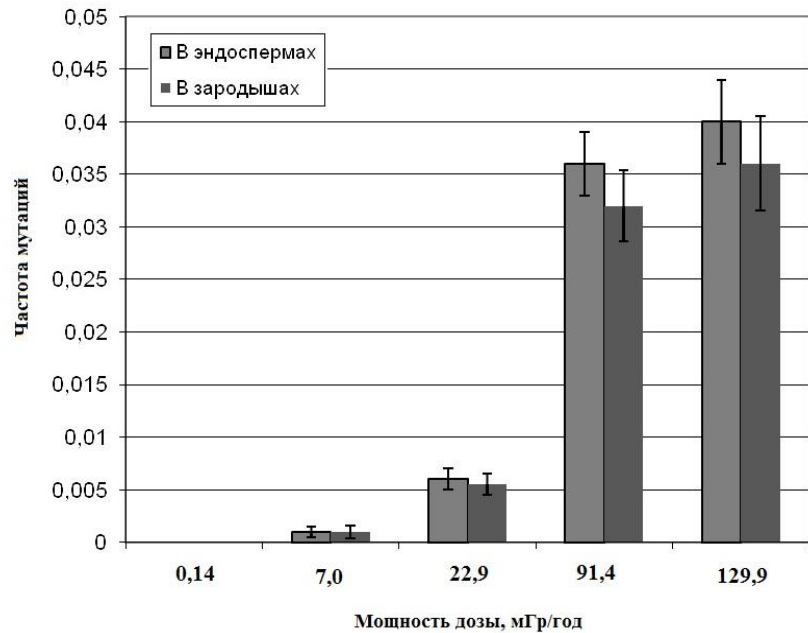


Рисунок 5 - Частота мутаций в локусах, кодирующих фермент SOD, для эндоспермов и зародышей семян (3249 локус-тестов)



Рисунок 6 - Генетическая дифференциация исследуемых популяций

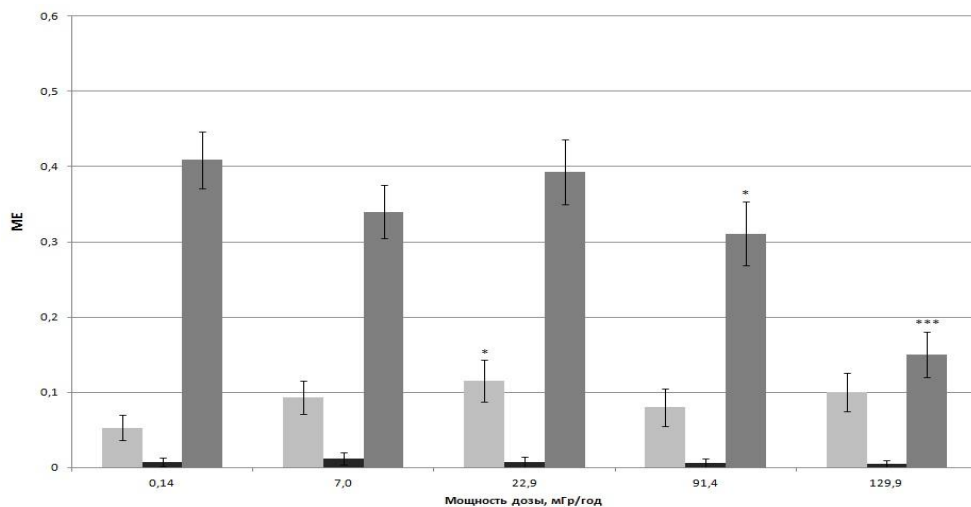


Рисунок 7- Активность каталазы, супероксиддисмутазы и пероксидазы в популяциях сосны обыкновенной, развивающихся в условиях хронического радиационного воздействия (* - $p < 0.05$; *** - $p < 0.001$, число проб - 2220)

Инкорпорированные в шишках радионуклиды могут оказывать воздействие на развитие семян. Содержание радиоактивных элементов в шишках может значительно отличаться от их содержания в других частях дерева и в почвах, на которых оно произрастает. Исследованные нами сосновые популяции произрастают на радиоактивно загрязненных территориях свыше 25 лет, поэтому в вегетативных и репродуктивных органах этих деревьев можно ожидать накопления высоких концентраций радионуклидов. В целом, активность ^{90}Sr и ^{137}Cs в шишках на изучаемых участках повышалась вместе с увеличением радиоактивного загрязнения почвы (табл. 1). Интенсивность поступления ^{137}Cs в древесные растения существенно ниже, чем ^{90}Sr , так как ^{137}Cs прочнее фиксируется в лесной почве, вследствие чего его доступность для корневых систем снижается. Вопреки вышесказанному, мы обнаружили, что активность ^{90}Sr в шишках на 1-2 порядка величины меньше, чем ^{137}Cs . Это связано с тем, что на исследуемых участках содержание ^{90}Sr гораздо ниже, чем содержание ^{137}Cs (Воробьев и др., 1994).

4.2 Оценка поглощённых доз в генеративных органах сосны обыкновенной.

Существенные различия в уровне радиоактивного загрязнения участков (табл. 1) создают хорошие предпосылки для проверки гипотезы о радиационной обусловленности наблюдаемых в экспериментальных популяциях биологических эффектов. Поглощённая в генеративных органах сосны доза на максимально загрязнённом экспериментальном участке (ЗК) составляет 130 мГр/год. Основной вклад в формирование дозы на генеративные органы сосны вносит содержащийся в верхнем 10-см слое почвы ^{137}Cs . Вклад β -излучения, в зависимости от участка, составляет 0,4-9,3% (табл. 2). При этом поглощённая в генеративных органах сосны доза от распределённых в пологе леса радионуклидов формируется, главным образом, за счёт β -излучения.

Дозы, поглощенные генеративными органами сосновых деревьев, спустя 25 лет после аварии на Чернобыльской АЭС примерно в 30 раз ниже, чем 0,4 мГр/час, принятой МАГАТЭ за безопасную для наземных растений (IAEA, 1992). С другой стороны, мощности дозы на наиболее загрязнённых участках ЗП и ЗК превышают 10 мкГр/час (87,6 мГр/год), предложенную в рамках европейского проекта ЭРИКА в качестве безопасного уровня радиационного воздействия (Andersson et al., 2009).

4.3 Электрофоретический анализ ферментов антиоксидантной системы.

Прямым доказательством усиления темпов мутационного процесса в популяциях, населяющих загрязненные радионуклидами участки, является увеличение частоты редких электрофоретических вариантов. Из результатов нашего и других (Волкова, Гераськин, 2012;

2013; Гераськин и др., 2009; Федотов и др., 1996) исследований следует, что радиоактивное загрязнение может вносить существенный вклад в индукцию мутаций, ведущих к потере ферментативной активности. Частота нуль-мутаций в популяциях, произрастающих на радиоактивно загрязненных территориях, значимо превышает контрольный уровень и растет вместе с дозой, поглощенной генеративными органами растений (табл. 4). Аналогичная ситуация наблюдается и для общего числа мутаций, с учетом изменения электрофоретической подвижности и дупликаций. Аномальные типы наследования продуктов ферментных локусов, обнаруженные в эндоспермах (мегагаметофитах) при электрофорезе, представляют собой результат мутаций или рекомбинаций структурных генов в материнских гаметах. Эти мутации связаны в основном с абберациями хромосом, ведущими к выпадению отдельных участков ДНК. Из представленных результатов следует, что частота мутаций изоферментных локусов в природных популяциях является чувствительным и информативным критерием при оценке генетических последствий хронического облучения в малых дозах.

Полученные по трем ферментам данные позволяют заключить, что генетические процессы в популяциях направлены на увеличение фенотипического разнообразия. Действительно, фенотипическое разнообразие по всем изученным локусам значимо ($P < 0,01$) превышает контрольный уровень (рис. 1), что связывают с реакцией популяции на стресс: в условиях давления техногенных факторов генетическая и фенотипическая изменчивость увеличивается, однако при чрезмерных уровнях стрессового воздействия наиболее чувствительные особи элиминируются, и внутривидовое разнообразие снижается (Гераськин и др., 2010; Духарев и др., 1992; Шуйская и др., 2012).

Согласно (Крутовский и др., 1989) оценки наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, основанные на анализе многочисленных исследований, выполненных на 26 видах рода *Pinus*, составили $H_o = 0.152 \pm 0.043$ и $H_e = 0.145 \pm 0.016$, что хорошо соответствует полученным в нашем исследовании оценкам для контрольной популяции ($H_o = 0.167 \pm 0.007$ и $H_e = 0.109 \pm 0.008$). В то же время, гетерозиготность популяций, населяющих загрязненные радионуклидами участки, превышает контрольный уровень и увеличивается вместе с плотностью радиоактивного загрязнения (рис. 3). В предыдущем исследовании на этих же популяциях, при анализе комплекса ферментов цикла Кребса, также было продемонстрировано (Гераськин и др., 2009), что наблюдаемая гетерозиготность в популяциях сосны с радиоактивно загрязнённых участков существенно выше, чем ожидаемая, и увеличивается вместе с мощностью дозы. Такой характер зависимости

гетерозиготности от степени техногенного загрязнения участков наблюдали и другие исследователи. Действительно, обитающие в неблагоприятных условиях популяции (суровый климат, техногенное загрязнение) характеризуются повышенной гетерозиготностью по сравнению с обитающими в оптимальных условиях (Животовский, 1984; Коршиков и др., 1991). Уменьшение уровня гетерозиготности у составляющих популяцию особей как правило связано (Алтухов, 2003; Theodorakis, 2011) со снижением сопротивляемости к болезням, уменьшением скорости роста и снижением фертильности. Имеются данные (Кальченко и др., 1991; Федотов и др., 2006; Theodorakis, 2011), что гетерозиготы лучше приспособлены к условиям техногенного стресса. Средняя наблюдаемая гетерозиготность популяций сосны обыкновенной, населяющих участки в зоне воздействия выбросов крупных химических предприятий, была выше ожидаемой и увеличивалась с ростом техногенной нагрузки (Духарев и др., 1992). В совокупности результаты этих исследований свидетельствует о селективном преимуществе гетерозигот в условиях хронического техногенного воздействия.

Известно, что ионизирующее излучение индуцирует возникновение реактивных форм кислорода в клетках животных и растений, что, в свою очередь, ведет к развитию оксидативного стресса. Исследованный нами полиморфизм ферментов антиоксидантной системы увеличивается вместе с уровнем радиоактивного загрязнения изучаемых участков. В (Inze, 1995) выдвинуто предположение, что варьирование величины стрессовых воздействий приводит к изменению выраженности оксидативного стресса. Уровень продукции реактивных форм кислорода также варьирует в зависимости от органа и клеточного компартмента. Это влечет за собой экспрессию тех генов, которые кодируют определенные изоформы, необходимые для защиты специфических клеточных компартментов. В условиях хронического радиационного воздействия роль SOD, GR и GPX как ферментов, элиминирующих супероксидный радикал и перекись водорода, существенно возрастает. Таким образом, наблюдаемый нами полиморфизм в генетических локусах, кодирующих данные ферменты, может быть связан с ключевой ролью этой ферментной системы в ликвидации активных форм кислорода. Возникновение редких аллелей в популяции и увеличение их частоты может трактоваться как процесс, направленный на получение отдельными особями эволюционного преимущества при существовании в условиях хронического оксидативного стресса. Если вновь возникшая мутация окажется выгодной в условиях техногенного стресса, которому подвергаются исследуемые популяции,

то с течением времени произойдет ее закрепление в генофонде и распространение в популяции.

Кластерный анализ разделил исследуемые популяции на две группы (рис. 6), что может быть связано как с их географическим положением, так и с хроническим радиационным воздействием. Так, техногенное загрязнение вызывало увеличение полиморфности и генетического разнообразия экспериментальных популяций фиалки трехцветной (*Viola tricolor* L.), что обусловило их выделение в отдельный кластер (Slomka et al., 2011). Вместе с тем, загрязнение тяжёлыми металлами не влияло (Muller et al., 2007) на генетическую подразделённость популяций маслёнка обыкновенного (*Suillus leteus*). В исследовании (Mengoni et al., 2000) показали, что на генетическую вариабельность популяций смолёвки оказывает влияние как географическое положение, так и загрязнение почв тяжёлыми металлами. В этом исследовании устойчивые к тяжёлым металлам популяции выделялись в отдельный кластер, несмотря на географическую близость с менее стрессоустойчивыми популяциями. Таким образом, на генетическую дифференциацию популяций влияют географическое положение, видовая принадлежность, тип и интенсивность техногенного воздействия, другие экологические факторы. Отметим, что популяции ЗП и ЗК географически гораздо ближе друг к другу, чем к остальным популяциям, поэтому их выделение в отдельный кластер может быть связано с их расположением и постоянным обменом генами. Обмен пылью и семенами между популяциями К, ВИУА и СБ невозможен из-за значительного расстояния между ними. Тем не менее, они объединены в один кластер, из-за одинаково низкой частоты встречаемости редких аллелей.

3.4 Активность антиоксидантных ферментов. Растения, в силу прикрепленного образа жизни и невозможности уклониться от стресса, выработали в ходе эволюции эффективную и разветвленную систему защиты от неблагоприятных воздействий. Многие из этих воздействий изменяют нормальный метаболизм растительных клеток, в том числе способны вызывать оксидативный стресс (Полесская, 2007). Следует отметить, что антиоксидантные системы даже в нормальных условиях не гарантируют клетке стопроцентную защиту от РФК: часть белков и компонентов мембран повреждаются РФК и заменяются новыми. Воздействие внешних факторов способно создавать значительный дисбаланс между образованием РФК, возможностями их ликвидации и скоростью репарационных процессов. Возникает ситуация, когда антиоксидантные системы не в силах сбалансировать уровень РФК, а системы репарации не успевают устранять повреждения

клеточных структур. В результате развивается окислительный стресс, который может быть обусловлен как сверхпродукцией РФК, так и падением эффективности антиоксидантной защиты, либо тем и другим.

Изменение активности ферментных систем у находящихся в условиях стресса растений было показано многими исследователями. В нашей работе при относительно низких уровнях радиационного воздействия активности каталазы и супероксиддисмутазы не демонстрируют (рис. 5) значимых отличий от контроля. Вместе с тем, активность пероксидазы с ростом уровня радионуклидного загрязнения снижается. В исследовании (Si et al., 2012) также показано, что активность пероксидазы в листьях табака увеличивалась в ответ на низкие концентрации нитробензола, тогда как более высокие концентрации вызывали снижение активности этого фермента по сравнению с контролем. Однако однозначно утверждать, что в условиях нашего эксперимента на активность достаточно неспецифичной пероксидазы влияет радиационное воздействие, мы не можем.

В работе (Zaka et al., 2012) было показано, что хроническое низкодозовое радиационное воздействие увеличивало антиоксидантную активность SOD, CAT и POD в потомстве растений *Stipa capillata*, произрастающих на участках Семипалатинского испытательного полигона (СИП) в Казахстане с мощностью дозы 25 мкЗв/час. Потомство облученных на территории СИП растений выращивалось в теплице на почвах с искусственно внесёнными радионуклидами. По оценкам авторов, поглощённая за период вегетации доза составляла 196 мЗв, что превышает максимальную годовую мощность дозы, наблюдавшуюся в нашем исследовании.

Заключение: В настоящей работе показано, что хроническое радиационное воздействие увеличивает общую частоту мутаций и долю редких аллелей в исследуемых популяциях. Но, поскольку мутационные события в семенах сосны обыкновенной относительно редки, они не вносят значительного вклада в наблюдаемую активность ферментов. Для полного понимания процессов, происходящих в хронически облучаемых в столь низких дозах популяциях необходим анализ эпигенетических характеристик геномов сосен из хронически облучавшихся популяций.

В целом, проведённое исследование позволяет сделать вывод о том, что, несмотря на повышенную частоту мутаций изоферментных локусов и изменения в генетической структуре популяций, вынужденных развиваться в условиях хронического радиационного воздействия, существующих значений доз (7-130 мГр/год) недостаточно для формирования значимых изменений на организменном и популяционном уровне.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на контрастных по уровню радиоактивного загрязнения участках Брянской области выполнено комплексное исследование генетической структуры и состояния антиоксидантной системы популяций сосны обыкновенной. Исследование включало в себя определение удельной активности радионуклидов и концентраций тяжёлых металлов в почвах и шишках на изучаемых участках, оценку с помощью специально разработанной дозиметрической модели поглощённых критическими органами растений доз, анализ изоферментного полиморфизма и активности ферментов антиоксидантной системы и установление связи наблюдавшихся биологических эффектов с дозой.
2. Исследованные экспериментальные участки являются контрастными по уровню радиоактивного загрязнения, но фоновыми по физико-химическим свойствам и загрязнению тяжёлыми металлами. Наибольший вклад в поглощённую генеративными органами растений дозу вносит ^{137}Cs . Мощности доз на экспериментальных участках варьируют от 7 до 130 мГр/год, по сравнению с 0,14 мГр/год на контрольном участке.
3. Показано увеличение частоты нуль-мутаций, дупликаций и изменений электрофоретической подвижности на зимограммах ферментов антиоксидантной системы, выявлена взаимосвязь между частотами мутаций и уровнями радиоактивного загрязнения участков.
4. Фенотипическое разнообразие в популяциях возрастает вместе с уровнем поглощённой дозы, доля редких морф в экспериментальных популяциях достоверно отличается от контроля. Уровень наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности возрастает от контрольной популяции к наиболее загрязнённой.
5. На основе полученных в работе данных оценены генетические расстояния между популяциями. По величине этого параметра исследуемые популяции разделились на два кластера, включающих наименее (ВИУА, СБ, контроль) и наиболее (ЗП, ЗК) загрязнённые популяции. Это свидетельствует о том, что хроническое радиационное воздействие в диапазоне мощностей доз 7-130 мГр/год можно рассматривать в качестве экологического фактора, способного менять генетическую структуру популяций сосны обыкновенной.
6. Анализ активности ключевых ферментов антиоксидантной системы не выявил какой-либо зависимости этого показателя от дозовой нагрузки. Наблюдаемые изменения активности ферментов не связаны с радиационным воздействием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Волкова, П.Ю. Анализ полиморфизма супероксиддисмутазы в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. - том 52. - № 4. - С. 370-380.
2. Волкова, П.Ю. Полиморфизм антиоксидантных ферментов в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Экологическая генетика. – 2013. – Том XI. - № 3. – С.44-58.

В сборниках статей и материалов конференций:

3. Гераськин, С.А. Изучение радиобиологических эффектов в популяциях сосны обыкновенной на подвергшейся радиоактивному загрязнению в результате аварии на ЧАЭС территории России / С.А. Гераськин, А.А. Удалова, П.Ю. Волкова и др. // Труды регионального конкурса проектов фундаментальных научных исследований, выпуск 17. - Калуга, 2012. - С. 220-229.
4. Волкова, П.Ю. Анализ полиморфизма ферментов антиоксидантной системы в популяциях сосны обыкновенной, населяющих контрастные по уровню радиоактивного загрязнения участки / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Сборник научных трудов лауреатов областных премий и стипендий. Вып. 7. – Калуга, 2013. – С. 136-144
5. Волкова, П.Ю. Влияние хронического радиационного воздействия на генетическую изменчивость в популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин, В.Г. Дикарев // Тезисы VI Международного съезда по радиационным исследованиям. – Москва, 2010. – С. 56.
6. Волкова, П.Ю. Генетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях хронического радиационного воздействия / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин, В.Г. Дикарев // Тезисы Российской научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии». – СПб: Фолиант, 2011. – С. 28.
7. Волкова, П.Ю. Генетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих в радиоактивно загрязнённых районах Брянской области / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы VIII Региональной научной конференции «Техногенные системы и экологический риск». Ч.3. – Обнинск, 2011. – С. 27-30.
8. Волкова, П.Ю. Анализ изоферментного полиморфизма в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих на загрязнённых в результате аварии на ЧАЭС территориях / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы Международной конференции «Чернобыль: опыт международного сотрудничества при ликвидации последствий аварии». - Обнинск, 2011. - С. 132-134.
9. Волкова, П.Ю. Анализ генетической изменчивости в популяциях сосны обыкновенной из загрязнённых радионуклидами районов Брянской области / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы Международной научной конференции «Радиация и Чернобыль: наука и практика». - Гомель, 2011. - С. 27-29.

10. Волкова П.Ю. Анализ изоферментного полиморфизма в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Сборник тезисов 16-й школы-конференции молодых учёных. – Пушино, 2012. – С. 303-304.
11. Volkova, P. Study of izozyme polymorphism in natural populations which undergo chronic radiation exposure / P. Volkova, S. Geras'kin, J. Prytkova et al // Ecotoxicology revisited. Proceedings of the 3rd SETAC CEE Annual Meeting. - Krakow, 2012. - P.87.
12. Волкова, П.Ю. Оценка полиморфизма ферментов антиоксидантной системы в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих в условиях хронического радиационного воздействия / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы докладов международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред». - Москва, 2013. - С.35.
13. Волкова, П.Ю. Анализ генетической дифференциации популяций сосны обыкновенной, произрастающих в условиях хронического облучения // Тезисы XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013». - Москва, 2013. - С. 354-355.
14. Волкова, П.Ю. Оценка биохимического полиморфизма в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной // Тезисы X региональной научной конференции «Техногенные системы и экологический риск». - Обнинск, 2013. - С. 103-105.
15. Волкова, П.Ю. Исследование биохимического полиморфизма хронически облучаемых растительных популяций / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы 17 Международной Пушинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пушино, 2013. - С. 102.
16. Волкова, П.Ю. Генетическая изменчивость хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Тезисы 13 Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2013 года: экологические проблемы XXI века». - Минск 2013. - С. 166-167.
17. Удалова, А.А. Радиобиологические эффекты в популяциях сосны обыкновенной в отдалённый период после аварии на ЧАЭС / А.А. Удалова, С.А. Гераськин, Н.С. Дикарева и др. // Тезисы 13 Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2013 года: экологические проблемы XXI века». - Минск, 2013. - С. 196.