Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАДИОЛОГИИ И АГРОЭКОЛОГИИ»
(ФГБНУ ВНИИРАЭ)

На правах рукописи

МАКАРЕНКО ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Специальность 03.01.01 – радиобиология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

А.А. Удалова

Обнинск – 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13
1.1 Воздействие хронического облучения на растения 13
1.2 Сосна обыкновенная как объект радиобиологических исследований 17
1.3 Состояние хвои сосны обыкновенной в условиях техногенного воздействия 26
1.4 Флуктуирующая асимметрия в условиях техногенного воздействия 29
1.5 Пыльца в качестве тест-объекта биоиндикации 33
1.6 Оценка генетического полиморфизма ДНК в популяционно-генетических исследованиях 38
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 45
2.1 Объект исследования 45
2.2 Радиоэкологическая обстановка на экспериментальных участках 45
2.3 Оценка морфометрических показателей хвои 52
2.4 Определение тератоморфных форм пыльцы 53
2.5 AFLP-анализ 54
2.5 Анализ данных 61
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 63
3.1 Оценка состояния хвои сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия 63
3.1.1 Определение длины и массы хвои сосны, произрастающей на радиоактивно загрязнённых территориях 63
3.1.2 Оценка индекса флуктуирующей асимметрии по морфометрическим показателям хвои 68
3.1.3 Поражение хвои некрозом в условиях хронического радиационного воздействия 74
3.1.4 Нарушения морфогенеза хвои в популяциях сосны обыкновенной 79

3.2 Оценка качества пыльцы сосны обыкновенной в условиях хронического облучения 80
3.2.1 Основные типы тератоморфных пыльцевых зёрен в исследуемых популяциях сосны обыкновенной 80
3.2.2 Редкие тератоморфные формы пыльцевых зёрен сосны обыкновенной 86
3.2.3 Заключение к разделу об аномалиях пыльцы сосны обыкновенной 89
3.3 Определение генетического полиморфизма в популяциях сосны 92
3.3.1 Оценка параметров генетического разнообразия с использованием AFLP-маркёров 92
3.3.2 Анализ частоты и спектра мутаций в хвое сосны с использованием AFLP-маркёров 96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 101
ВЫВОДЫ 105
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Радиоактивное загрязнение является техногенным фактором, оказывающим влияние как на население, проживающее на радиоактивно загрязнённых территориях, так и на природные биогеоценозы, флору и фауну. При изучении последствий радиационных аварий для природных экосистем особенное внимание уделяют популяциям растений как структурной и функциональной основе биоценоза. В ранние периоды после крупных радиационных аварий, характеризующиеся высокими уровнями ионизирующего излучения, был проведён широкий спектр исследований природных популяции растений. Так, большое количество исследований выполнено в 10- и 30-км зонах Чернобыльской АЭС [1, 58, 69, 130], где уровни радиационного воздействия были особенно высоки. Однако, отдалённые радиобиологические эффекты в популяциях растений, произрастающих при относительно невысоких уровнях радиоактивного загрязнения, изучены фрагментарно. При этом исследование последствий длительного обитания видов в условиях хронического стрессового воздействия имеет большое значение для понимания механизмов адаптации природных популяций, что определяет актуальность выбранной темы исследования.

В России наибольшему радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС подверглась Брянская область. Площадь лесов в области составляет 26%, из которых к сосновым относится более 40%. Почти 40% лесного фонда Брянской области находится в зоне с плотностью загрязнения почвы по ^{137}Cs выше 5 Ки/км^2 [114].

Сосна обыкновенная внесена в список референтных растений и животных, рекомендованных Международной комиссией по радиационной защите (МКРЗ) для проведения оценки и ограничения радиационного воздействия на окружающую среду в условиях хронического облучения [180]. МКРЗ предлагает рассматривать 40–400 мГр/год в качестве скринингового диапазона мощностей доз при хроническом облучении сосны [180], что делает актуальным проведение

радиобиологических исследований в популяциях сосны, произрастающих в районах, загрязнённых радионуклидами в результате радиационных аварий.

Выявление диапазонов чувствительности биологических показателей на разных уровнях иерархической организации живого позволяет оценить комплексный эффект облучения для растения и выделить наиболее чувствительные показатели для использования в биомониторинговых исследованиях на радиоактивно загрязнённых территориях. Оценка морфометрических показателей хвои позволяет изучить биологические эффекты на органном уровне сосны и оценить степень нарушения развития организма по показателю флуктуирующей асимметрии. Определение частоты тератоморфных пыльцевых зёрен, представляющих изолированные клеточные системы, имеет большое значение для выявления репродуктивного потенциала популяции. Использование молекулярных маркёров способствует расширению понимания генетических процессов в растениях, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях.

Степень разработанности проблемы. В начале 60-х годов были получены первые данные о высокой радиочувствительности хвойных растений [238]. Впоследствии эффекты радиационного воздействия на сосне обыкновенной изучали в многочисленных исследованиях на Восточно-Уральском радиоактивном следе (ВУРСе), на загрязнённой после Чернобыльской аварии территории, вблизи АЭС Фукусима [1, 21, 56, 57, 68, 117, 128, 171, 198, 236, 245, 255 и многие другие].

При изучении радиационно-индуцированных нарушений вегетативных органов сосны анализировали разнообразные биологические показатели, в том числе, на побегах: прирост, число почек, некротированность, вторичный рост побегов [69, 130], ориентация, ритмика роста, временные сдвиги ростовых процессов [68, 69]; на хвое сосны: пожелтение и опадение хвои, содержания хлорофилла [121, 238], длину и массу в первые годы после аварии на ЧАЭС [69, 130], морфозы, морфолого-анатомические особенности листового аппарата, ультраструктурную организацию, гистометрические характеристики основных тканей [70].

На генеративных органах сосны обыкновенной в условиях радиационного воздействия определяли: макроспорогенез и гаметогенез, развитие женского гаметофита, эмбриогенез [69], размер пыльцевых зёрен [48], радиоустойчивость прорастания пыльцы и рост пыльцевой трубки, клеточные ультраструктуры [28], аномалии пыльцевых трубок [119], уровень внутрипопуляционной изменчивости жизнеспособности пыльцы [113], хромосомные аномалии [69, 119], оплодотворяющую способность пыльцы [69]. На семенах, являющихся конечным результатом всех эмбриологических процессов, изучены репродуктивные качества [49, 130] с оценкой влияния на них погодных условий [22] и эффекта радиоадаптации [23, 69], спектр цитогенетических нарушений, жизнеспособность семенного потомства [23], прохождение стадий мейоза, число хромосом [69].

Изменение генетической структуры природных популяций под воздействием ионизирующего излучения было показано в работах В.А. Кальченко с соавт. [55], В.А. Шевченко с соавт. [141], И.С. Федотова с соавт. [130]. На сосне обыкновенной изучали частоту и спектр мутаций в ферментных локусах [57], полиморфизм изоферментных локусов, генотипическое разнообразие, гетерозиготность, долю редких аллелей, эффективное число аллелей, активность ферментов [50, 175, 247]. При изучении генетических процессов в популяциях сосны на радиоактивно загрязнённых территориях анализировали также эпигенетическую изменчивость [259], метилирование генома [193, 248], ДНК-полиморфизм [200], пролиферативную активность клеток [140], микроэволюционные изменения [69].

Основная масса работ была выполнена на территориях с высокими уровнями радиоактивного загрязнения, в первые 5-10 лет после радиационных аварий. Несмотря на значительный прогресс в понимании процессов формирования радиобиологической реакции у сосны обыкновенной, в особенности в ответ на острое облучение, знания о реакции этого референтного вида МКРЗ на хроническое низкодозовое облучение остаются фрагментарными. В частности, существуют лишь отрывочные сведения о морфометрических и морфологических показателях хвои и пыльцы сосны в дальней зоне радиационных аварий. Вместе с тем, определение диапазона чувствительности ряда биологических показателей при хроническом

облучении внесёт вклад в развитие методических подходов к оценке последствий радиационного воздействия для биоты. В этой связи следует подчеркнуть, что технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации её загрязнения, согласно Указу Президента РФ N 899 от 7 июля 2011 г., относятся к числу критических технологий Российской Федерации.

Целью диссертационной работы является оценка морфологических параметров и генетического полиморфизма в природных популяциях сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- изучить морфологические и морфометрические показатели хвои в популяциях сосны обыкновенной, испытывающих хроническое радиационное воздействие;
- изучить морфологические аномалии пыльцы у сосны обыкновенной на радиоактивно загрязнённых территориях;
- оценить генетический полиморфизм, а также частоту и спектр мутаций в популяциях, произрастающих на территориях с разным уровнем радиоактивного загрязнения.

Научная новизна. Впервые на радиоактивно загрязнённых территориях в отдалённый период после Чернобыльской аварии изучены как морфологические показатели вегетирующих и репродуктивных органов, так и генетический полиморфизм в популяциях сосны обыкновенной в параллельно выполняемых исследованиях. Показано отсутствие устойчивого значимого эффекта радиационного воздействия в диапазоне мощностей доз 10–130 мГр/год на морфометрические показатели хвои. Впервые в условиях хронического низкодозового радиационного воздействия показано, что индекс флуктуирующей асимметрии, оценённый по длине парных хвоинок, в отличие от данного показателя для их массы, может зависеть от уровня радиоактивного загрязнения. Показана повышенная частота брахибласт с тремя хвоинками на участках, испытывающих хроническое радиационное воздействие. Установлена

повышенная частота аномалий пыльцы сосны обыкновенной на радиоактивно загрязнённых территориях, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Впервые в популяциях сосны обыкновенной при помощи метода оценки полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (AFLP) показано, что среднее генетическое разнообразие на локус по Неи повышено на радиоактивно загрязнённых участках, а генетическая дифференциация популяций внутри географических групп согласуется с уровнем поглощённой в кронах сосны дозы.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты вносят вклад в изучение фундаментальных закономерностей адаптационных процессов, происходящих в природных популяциях в условиях радиационного воздействия. Наличие всесторонних данных о влиянии хронического облучения в малых дозах позволит создать прочную научную базу для понимания отдалённых биологических последствий реально встречающихся в современной биосфере уровней радиационного воздействия. Практическая значимость полученных данных связана с возможностью их использования для совершенствования существующей системы контроля состояния окружающей среды. Дополнение традиционной системы экологического мониторинга методами биоиндикации с использованием высших растений способно повысить надёжность и обоснованность оценок экологического риска.

Методология и методы исследования. В качестве объекта исследования выбраны природные популяции сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L., являющейся классическим объектом исследования популяционной генетики, экологии, радиобиологии. Сосна обыкновенная – основной лесообразующий вид Северной Евразии, являющийся видом-эдификатором и ценной породой в лесоводстве. Оценивали последствия хронического облучения сосны обыкновенной в отдалённый период после аварии на Чернобыльской АЭС на территории Брянской области Российской Федерации и Гомельской области Республики Беларусь. В качестве характеристик радиационного воздействия использовали мощность экспозиционной дозы (МЭД), удельные активности ^{137}Cs

в почве на глубине 0–5 см, 5–10 см, 10–15 см, удельные активности ^{137}Cs и ^{90}Sr в шишках, расчетные значения поглощённой дозы в кронах сосны.

В 2011, 2013, 2014, 2016 гг. оценивали морфологические и морфометрические показатели хвои: длину и массу, индекс ФА по длине и массе, частоту и класс поражения некрозом, морфозы. Типы и частоту аномалий развития пыльцевых зёрен сосны анализировали в 2013, 2014, 2016 гг. Генетический полиморфизм в популяциях сосны изучали с использованием метода оценки полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК, полученные данные использовали для расчёта среднего генетического разнообразия на локус по Неи, генетических расстояний по Неи, числа полиморфных локусов, частоты нуль-мутаций и изменений электрофоретической подвижности.

Положения, выносимые на защиту

1. В популяциях сосны обыкновенной, произрастающих на радиоактивно загрязнённых участках Брянской и Гомельской областей, в отдалённый период после Чернобыльской аварии имеют место изменения морфологических параметров хвои, пыльцы и генетического полиморфизма.

2. Наиболее чувствительными морфологическими индикаторами радиобиологических эффектов у сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия с мощностью дозы до 130 мГр/год являются индекс флуктуирующей асимметрии по длине хвои и частота появления аномальной пыльцы, которые возрастают с увеличением поглощённой в кронах деревьев дозы.

3. Согласно результатам AFLP-анализа генетического полиморфизма, в популяциях сосны обыкновенной на радиоактивно загрязнённых территориях повышено генетическое разнообразие; при этом радиационное воздействие в малых дозах вносит вклад в кластеризацию популяций, хотя географический фактор играет более существенную роль в генетическом подразделении популяций.

Достоверность результатов. Достоверность полученных результатов определяется применением методик, используемых в мировой научной практике, и современного оборудования. В работе использовали большие объёмы экспериментальных данных, достаточные для получения значимых оценок изучаемых параметров, что обеспечивает необходимую степень достоверности полученных результатов. Полученные данные анализировали, применяя пакеты статистического анализа экспериментальных данных (MS Excel, Statistica, RawGeno в R CRAN, AFLPsurv). Экспериментальные исследования повторяли в течение нескольких лет.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 03.01.01 «Радиобиология», охватывающей принципы и методы радиационного мониторинга (п. 10) и отдалённые последствия действия излучений, хроническое действие радиации, особенности биологического действия малых доз облучения (п. 11), в диссертационном исследовании представлены результаты по оценке воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в малых дозах на популяции сосны обыкновенной.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены на: 17-ой, 18-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013, 2014); Международной научной конференции, посвящённой 25-летию Института радиобиологии (Гомель, 2012); X региональной научной конференции «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2013); III International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity (Barcelona, 2014); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2014); XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2015»: Секция «Биология» (Москва, 2015); Meeting in St. Petersburg: Fourth International Conference, Dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky and His Scientific School «Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and

Evolution» (Санкт-Петербург, 2015); Молодёжной конференции с международным участием «Взгляд молодых учёных на современные проблемы развития радиобиологии, радиоэкологии и радиационных технологий» (Обнинск, 2016); Международной научной конференции, посвящённой 80-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова и 45-летию лаборатории популяционной генетики ИОГен РАН «Генетика популяций: прогресс и перспективы» (Москва, 2017); IV International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity (Berlin, 2017); XIII международной молодежной научно-практической конференции «Будущее атомной энергетики – AtomFuture 2017» (Обнинск, 2017); Молодёжном круглом столе «Современные проблемы радиобиологии и радиоэкологии» в рамках XLVI Радиоэкологических чтений им. В.М. Клечковского (Обнинск, 2017).

Результаты исследования были получены при выполнении проектов, поддержанных РФФИ (№ 11-04-00670; № 12-04-97550), РНФ (№ 14-14-00666).

Личный вклад диссертанта в работу. Соискатель непосредственно участвовала в постановке цели и задач исследований, планировании и организации представленной работы. Теоретическая и экспериментальная часть работы (включая экспедиции на радиоактивно загрязнённые территории, полевые и лабораторные исследования), статистическая обработка данных выполнены самостоятельно. Соискатель проанализировала большой объём литературы, принимала активное участие в интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций, представляла полученные результаты на российских и международных конференциях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертационной работы. Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 260 источников, из которых 114 на иностранном языке. Диссертация изложена на 135 страницах, содержит 19 таблиц и 15 рисунков.

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность за помощь в работе над диссертацией научному руководителю, доктору биологических наук Удаловой Алле Александровне, доктору биологических наук, профессору Гераськину С.А., а также кандидату биологических наук Волковой П.Ю. за помощь в планировании и проведении лабораторных экспериментов, обсуждении полученных результатов.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Воздействие хронического облучения на растения

С начала XX в. и по настоящее время не утрачивают актуальность исследования влияния хронического действия ионизирующего излучения на природные популяции растений и животных, которые приобрели особое значение для территорий, пострадавших в результате радиационных аварий на ПО «Маяк», Чернобыльской и Фукусимской АЭС.

Биологические эффекты ионизирующего излучения разнообразны, так как степень их проявления зависит от вида, возраста, морфологии организма, занимаемой экологической ниши, радиочувствительности, питания и способа размножения, физиологии и организации генома, а также от биофизических характеристик излучения (мощности дозы, ОБЭ, ЛПЭ).

В результате обширных работ по изучению состояния растительных популяций, типичных для Чернобыльской зоны, были зарегистрированы различные морфогенетические изменения на 96 видах растений, относящихся к 28 семействам [73]. Отмечено, что при хроническом облучении в высоких дозах происходит смена лесообразующих пород с семенным путём восстановления на лесообразующие виды со способностью к вегетативному размножению (корневой, пневой, стволовой порослью), как правило, место сосны занимает берёза [65]. У растений в зонах радиоактивного загрязнения часто наблюдается угнетение роста и развития. Так, у древесных растений снижение прироста биомассы означает поражение камбия [258]. В зоне ВУРСа пониженный прирост биомассы указан как основной фенотипически проявляющийся эффект [239]. У описанных деревьев часто наблюдается повышенная ветроломкость стволов, значительная часть которых ломается в течение двух лет. Подобное явление наблюдали в зоне аварии на ЧАЭС, причём наибольший процент гибели отмечен у деревьев низших рангов с угнетённым ростом [1, 65].

Изучение жизнеспособности, радиочувствительности и мутабильности семенного потомства травянистых растений, произрастающих в зоне ВУРСа

(одуванчик лекарственный, дрёма белая, звездчатка злаковая, подорожник средний, гравилат алеппский и др.), проводили через 50 лет после Кыштымской аварии [99]. По скорости формирования листьев угнетающий эффект отмечен у 9 ценопопуляций, а по длине корней – у 7 из 11 ценопопуляций, исследованных в зоне ВУРСа. В большинстве ценопопуляций разных видов растений частота морфологических аномалий проростков (изменения и некрозы органов, нарушения гелиотропизма, хлорофилльные аномалии и др.) была выше, чем в фоновых популяциях.

Так как растения особенно уязвимы из-за прикрепленного образа жизни и не могут избегать вредных воздействий окружающей среды, то должны адаптироваться к жизни в суровых условиях. Растительные популяции, растущие в течение длительного времени под воздействием ионизирующего излучения, могут стать более радиорезистентными, в то время как другие становятся более радиочувствительными [112, 240]. На разных видах дикорастущих травянистых растений (горошек узколистный, вероника лесная, клевер горный, лапчатка гусиная и др.) было показано, что многолетнее (7–10 лет) воздействие ^{90}Sr приводит к увеличению их радиоустойчивости по сравнению с контрольными растениями, выражающемуся в увеличении всхожести собранных на загрязнённых площадках семян и снижении числа хромосомных аберраций в проростках после дополнительного острого облучения [136]. При этом адаптация, в основном, наблюдается только у некоторой части видов, произрастающих на техногенно загрязнённой территории. В районе ВУРС радиоустойчивость радиочувствительных видов растений выросла в 3–4 раза и практически не изменилась у населяющих те же участки устойчивых к облучению видов [139]. Таким образом, повышенная радиорезистентность семян растений, произрастающих при хроническом облучении, не является облигатным свойством, формирование этого признака происходит с неодинаковой скоростью либо отсутствует в разных радиоэкологических условиях.

В ходе многолетнего мониторинга состояния травянистых растений, произрастающих на ВУРСе (василька шероховатого, скерды кровельной, чины

гороховой) [139, 142] и в зоне отчуждения ЧАЭС (скерды кровельной, ржи посевной и пшеницы мягкой) [45, 138, 144] обнаружено повышение частоты аберрации хромосом в меристемах проростков по сравнению с контрольными популяциями. Помимо этого, радиационное воздействие способствует увеличению частоты однонитевых разрывов ДНК [240], а также нарушению устойчивости генома [191, 192]. Среди генетических эффектов в хронически облучаемых популяциях растений на ВУРСе характерным показателем является повышенная частота генных мутаций. Частота хлорофилльных мутаций, которые также относятся к генным мутациям или микроделециям, в проростках василька шероховатого даже спустя четыре десятилетия после Кыштымской аварии значительно превышала контрольное значение [56, 59]. Длительное сохранение хлорофилльных и других генных мутаций, являющихся частью генетического груза популяции, отрицательно воздействует на жизнеспособность и плодовитость несущих их особей и может сказываться на общем состоянии популяции многие поколения.

В вопросах мутагенного действия радиации радиоэкология тесно смыкается с проблемами современной генетики. В настоящее время в радиобиологии разрабатывается концепция действия низкоинтенсивных ионизирующих излучений на биоту, связывающая нелинейный характер дозовой зависимости в области малых доз с изменением отношения повреждающих и репарирующих реакций в клетках [11, 20]. При этом выделяют четыре качественно различных типа ответных реакций клеток в зависимости от интенсивности воздействия. При самых низких дозах генетическая эффективность облучения ниже скорости образования спонтанных нарушений. Увеличение нагрузки активизирует репарационные системы, и в результате выход генетических повреждений может быть ниже фонового уровня. Дальнейший рост дозы приводит к триггерному переключению клеток в иной режим функционирования, при котором начинают работать системы SOS-репарации. Уровень генетических повреждений при этом повышается и остаётся в определённом дозовом интервале стабильным, формируется плато на кривой доза-эффект. При дальнейшем увеличении дозы

возможности систем репарации недостаточны, и число повреждений молекул ДНК монотонно возрастает.

Влияние хронического воздействия малых доз ионизирующих излучений на природные популяции растений и животных изучено недостаточно полно. Это связано с необходимостью поиска удобного, генетически хорошо изученного объекта, методическими трудностями постановки экспериментов в природных условиях, где достаточно трудно вычленить эффект от действия малых доз радиации в совокупном воздействии обычных экологических факторов.

Анализ литературных данных показывает, что в условиях высоких уровней облучения (например, в первый период после радиационных аварий) были получены данные о морфологических и физиологических изменениях у растений, в то время как в случае относительно невысоких уровней хронического облучения (в отдалённый период после аварий) преимущественно изучались генетические, цитогенетические и, в отдельных работах, репродуктивные показатели растительных популяций. Таким образом, существует пробел в знаниях о действии хронического низкодозового облучения на показатели органного и организменного уровня у растений, на заполнение которого отчасти направлена настоящая работа. Действительно, в данном исследовании были изучены три группы показателей у сосны обыкновенной как одного из наиболее радиочувствительных представителей флоры. Регистрация морфометрических показателей хвои позволяет изучить биологические эффекты на органном уровне сосны и оценить степень нарушения развития организма по показателю флуктуирующей асимметрии. Определение качества пыльцевого зерна, представляющего собой изолированную клеточную систему – носитель генетической информации, – имеет большое значение для выявления репродуктивного потенциала популяции. Использование метода AFLP расширяет понимание генетических процессов, способствующих адаптации растений на радиоактивно загрязнённых территориях. Таким образом, данная работа включает в себя оценку биологических эффектов на разных уровнях организации при хроническом радиационном воздействии.

1.2 Сосна обыкновенная как объект радиобиологических исследований

Род *Pinus* содержит в себе около 100 видов и является широко распространённым в северном полушарии (рис. 1).

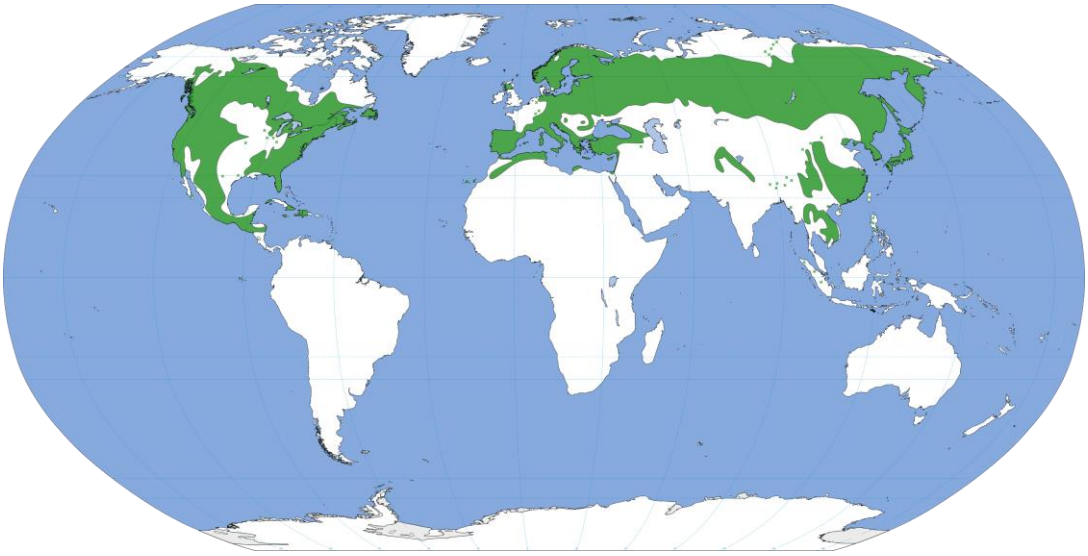

Рисунок 1 – Карта ареала рода *Pinus* [223]

В Северной Евразии основным лесообразующим видом является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), в природных сообществах относящаяся к эдификаторным видам, определяющим лицо фитоценоза и в существенной степени влияющим на жизнь других растений. Сосна обыкновенная также является эврибионтным видом с широким диапазоном толерантности к естественным факторам.

Pinus sylvestris является одним из главных природных объектов для экологического и генетического мониторинга, а после аварии на ЧАЭС – одним из главных видов для исследования воздействия излучения на организмы. Данные о высокой радиочувствительности хвойных растений были получены ещё в начале 60-х годов в Брукхейвенской лаборатории США [238] и дополнены в ходе эксперимента "Экос" [60]. Масштабное подтверждение высокой чувствительности к ионизирующему излучению было получено в естественных условиях на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа и ближней зоны Чернобыльской АЭС. На загрязнённых в результате аварии на ПО «Маяк»

территориях к осени 1959 г. сосна полностью погибла на площади 2000 га [3]. После аварии на ЧАЭС площадь летального поражения сосновых лесов составила 500–600 га, а сосновых насаждений с сильной и средней степенью повреждения, соответственно, – 3000 и 12000 га [67].

В качестве тест-систем на сосне используют морфометрические показатели (масса семян, толщина годичных колец, длина и масса хвои и др.), частоту и тип морфозов, репродуктивные качества (всхожесть и энергия прорастания семян, аномальные формы пыльцевых зёрен и трубок и др.), частоту и спектр аберраций хромосом в корневой меристеме проростков и в интеркалярной меристеме хвои, содержание фитогормонов, анализ активности и полиморфизма ферментов, оценку уровня метилирования и т.д. Особенно перспективны генетические тесты, поскольку они позволяют обнаружить эффект даже при незначительном антропогенном воздействии.

У хвойных растений все органы и ткани, формирующие репродуктивные структуры, относятся к критическим: археспориальные ткани, мейоциты, свободноядерный женский гаметофит, гаметы и эмбрионы, особенно на первых стадиях формирования. В клетках хвойных растений очень крупные ядра, хромосомные наборы содержат в несколько раз больше ДНК, чем у покрытосеменных растений [63]. Большой размер генома по сравнению с большинством других растений, достигающий 24.6 Гб [147] и большие интерфазные хромосомы объёмом до 61.1 мкм^3 [163], по всей вероятности, способствовали одной из самых высоких чувствительностей к излучению (LD_{50} 5–20 Гр) среди исследованных видов [110].

Минимальная мощность дозы, которая вызывает после нескольких лет облучения изменения в семяобразовании и скорости роста сосны, составляет 0.02 Гр/сутки или 7.3 Гр/год [115, 238]; максимальной безопасной мощностью дозы (без учета генетических эффектов), по мнению [115], является 0.002 Гр/сутки – при внешнем гамма-облучении с такой мощностью дозы в течение нескольких лет соматические эффекты не были обнаружены.

Таким образом, благодаря широкому ареалу распространения, высокой

радиочувствительность и информативности сосна обыкновенная входит в число основных природных тест-объектов эколого-генетического мониторинга радиоактивного загрязнения.

Радиационно-индуцированные нарушения вегетативных органов хвойных. В качестве объекта радиобиологических исследований у хвойных наибольший интерес вызывают органы, растущие активно – хвоя, побеги текущего года и генеративные органы (шишки, пыльца). Наличие в этих органах тканей с делящимися клетками создаёт потенциальную опасность для возникновения соматических мутаций в вегетативных органах, в том числе за счёт внутреннего облучения. Согласно [181] самая высокая концентрация активности ^{90}Sr и ^{137}Cs наблюдается в хвое/листьях, молодых побегах и внутренней части коры деревьев, в то время как древесина является наименее загрязнённой радионуклидами.

При облучении в высоких дозах можно наблюдать различные нарушения вегетативных органов: образование морфозов, угнетение прироста побегов, опадение хвои, изменение её размеров, аномалии заложения почек и т.д. [68, 69], причём наибольшее угнетение роста растений наблюдается в весенний период [60, 117]. При облучении в дозах 5–12 Гр число почек в апикальной меристеме доходило до 30, зачаточные побеги утолщались, встречались трёх- и даже четырёххвойные брахибласты, аномальные побеги с укороченным приростом, почки с некротированным меристематическим апексом. На отдельных экземплярах сосны с поглощёнными дозами 3–8 Гр встречались вторичные приросты побегов, «израстание почечных чешуй».

Временные сдвиги ростовых процессов, нарушения нормальной ориентации побегов, аномальная ритмика роста, вторичный рост побегов, карликовость и гигантизм вегетативных органов позволяют сделать вывод об эндогенных процессах, возникающих под воздействием ионизирующей радиации и приводящих к изменениям в гормональной системе сосны. В первый период после острого облучения угнетение активности меристем приводит к резкому снижению синтеза ауксинов. Последующие репарационные процессы сопряжены

с быстрым возрастанием активности стимуляторов. При этом более высокие дозы ионизирующего излучения, не сопровождающиеся гибелью отдельных органов или всего растения, вызывают преобладание стимуляторов роста в системе ингибиторы-стимуляторы. Эту гипотезу подтверждает интенсивный рост побегов и мощное развитие хвои в 1987 г. на участках с сильной и средней степенью радиационного поражения, на которых в весенне-летний период 1986 г. было отмечено наибольшее подавление ростовых процессов [68, 69].

Согласно исследованиям [130] в лесонасаждениях, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений в дозах от 0.5 до 1.0 Гр, наблюдали явление стимуляции, которое в вегетационный сезон 1986 г. проявилось в увеличении прироста годичных побегов. По другим показателям роста и развития насаждения сосны в этой зоне не отличались от контроля. Влияние острого облучения на хвою сосны обыкновенной изучалось, в частности, в работах Г.М. Козубова [68], где было показано, что при поглощённых дозах 0.7–1 Гр проявляется гигантизм листового аппарата. Через 4–5 месяцев после аварии на ЧАЭС у сосны обыкновенной на значительных площадях были обнаружены нарушения в морфогенезе надземных органов, подавление ростовых процессов, массовый некроз ростовых побегов, а при высоких поглощённых дозах – полное отмирание надземной части.

В интервале поглощённых доз от 1 до 5 Гр наблюдали слабую степень поражения сосны [130], характеризующуюся уменьшением годичного прироста, морфологическими изменениями вегетативных органов (колебания длины хвои, усиленное почкование на верхушках годовых побегов, возникновение вторичного прироста). Видимые эффекты, вызванные ионизирующими излучениями в дозах 1–5 Гр, проявились в первые два года после аварии, а в последующие годы они нормализовались.

При 5–15 Гр проявилось угнетение роста побегов, хвои, прироста древесины, повреждения части кроны и гибели низких классов бонитетов деревьев. В лесонасаждениях сосны, облучённых этими дозами, наблюдали изменение морфогенеза вегетативных органов, изменение ультраструктуры хвои,

подавление роста меристематических тканей, снижение прироста древесины по диаметру [130].

В 1987–1988 гг. в основном в зоне сублетального поражения сосны были найдены аномальные хвоинки с различной степенью срастания пар хвои: а) круглые хвоинки с одной цилиндрической проводящей системой, представляющие собой полностью сросшиеся по всей длине две хвоинки; б) хвоинки с общим проводящим цилиндром, имеющим на поперечном срезе серповидную форму, с глубокой бороздой по всей длине сросшихся хвоинок; в) хвоинки с двумя обособленными проводящими цилиндрами и глубокой бороздой срастания по всей длине хвои [70].

Как указано выше, высокой радиочувствительностью отличаются ткани и органы растений на стадии их формирования, в процессе дифференцировки, и как следствие к уязвимым относится репродуктивная система растений.

Радиационно-индуцированные нарушения генеративных органов хвойных. Радиобиологические исследования хвойных растений показали высокую радиочувствительность их репродуктивной сферы, особенно на стадиях мейоза и постмейотических делений при микро- и макроспоро-, а также гаметогенезе. Были отмечены удлинение прохождения стадии мейоза, редукция числа хромосом, снижение оплодотворяющей способности пыльцы и всхожести семян, другие нарушения генеративной сферы хвойных [69].

В качестве одного из оценочных показателей состояния мужской генеративной сферы растений в условиях хронического облучения используют морфологические особенности и качество пыльцы. Пыльцевые зёрна (п.з.) в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды имеют ряд неоспоримых преимуществ: они чувствительны к радиационному воздействию и реагируют морфологическими изменениями на ухудшение экологического состояния радиоактивно загрязнённых районов; к тому же пыльцевые зёрна обеспечивают большое количество фенотипов, которые могут быть легко оценены с помощью светового микроскопа [220].

В 1987–1990 гг. были детально изучены [69] особенности мейотического процесса в макроспороцитах, развитие женского гаметофита и эмбриогенез в семяпочках сосны, подвергшихся облучению в дозах от 0.7–1.2 до 20–25 Гр. По данным этих исследований, в женской репродуктивной системе ионизирующее излучение вызывает значительно большее разнообразие аномалий, чем в мужской. Как правило, значительная часть подобных аномалий завершается некрозом семяпочек и образованием пустых семян. Как и в мужской сфере, наибольшее число нарушений было отмечено в I мейотическом делении макроспороцитов, а во II делении, в основном, преобладали отклонения в митозе верхней клетки диады, что, однако, мало отражалось на дальнейшем ходе мейоза. При дозах 2.5–3.0 и 5–8 Гр значительное количество аномалий наблюдалось как в I, так и во II мейотическом делениях, в том числе и нижней клетке диад, что обычно завершалось полным некрозом семяпочек. Весьма чувствительным является свободноядерный женский гаметофит, особенно его первые этапы. Из семяпочек с некротированным гаметофитом чаще всего формировались пустые семена. В облучённых семяпочках в ряде случаев не закладывались архегонии, что также приводило к их некрозу [69].

Из генеративных органов интересны в качестве тест-системы для биоиндикации семена сосны, являющиеся конечным результатом всех эмбриологических процессов. Их состояние характеризует успешность прохождения всего генеративного цикла. Репродуктивный цикл у сосны весьма растянут – от момента заложения примордиев генеративных органов до созревания семян проходит 28 месяцев. Все изученные виды голосеменных, по сравнению с большинством покрытосеменных растений, отличаются низкой радиоустойчивостью семян. Семена сосны обыкновенной, в зависимости от условий облучения, имеют $ЛД_{50}$ 9–30 Гр [110]. Критической дозой облучения, при которой большая часть жизнеспособных семян сосны теряет способность к росту, является 30–50 Гр [104].

В 1986 г. в 30-километровой зоне Чернобыльской АЭС значительное снижение репродуктивной способности (уменьшение массы семян и их

количества на шишку, увеличение доли абортивных семян) было обнаружено [49, 130] в популяциях сосны обыкновенной, получивших дозы более 1 Гр. Через 11 лет после аварии сниженная репродуктивная способность сохранилась в популяциях сосны, получивших в год аварии дозы более 10 Гр [130]. Хроническое радиационное воздействие в диапазоне мощностей доз 4.2–6.3 мкГр/ч приводило к статистически значимому уменьшению массы семян и увеличению фракции абортивных семян [53]. Увеличение доли пустых семян и снижение выживаемости проростков в популяциях сосны обыкновенной, населяющих участки с повышенными концентрациями радионуклидов уранового и ториевого рядов, было обнаружено [36], начиная с мощности дозы 11.3 мкГр/ч.

В популяциях сосны обыкновенной, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях в Брянской и Гомельской областях (эти популяции являются объектом исследований в настоящей работе), однако, не обнаружено устойчивой связи качества семенного потомства с уровнем радиоактивного загрязнения участков или поглощённой в генеративных органах сосны дозой [23]. Тем не менее, было установлено, что хроническое радиационное воздействие способно модифицировать влияние погодных факторов на формирование семенного потомства: совместное влияние в мае влажности воздуха и хронического облучения способствовало увеличению доли абортивных семян и снижению всхожести, при этом с ростом температуры за весь период формирования семян и в августе второго года наблюдалось увеличение доли абортивных семян [22].

Было установлено, что на радиочувствительность тех или иных видов хвойных влияют их морфофизиологические особенности, обусловленные генетическими свойствами, а также своеобразие и длительность репродуктивного цикла, повышенные размеры хроматинового комплекса, содержание ДНК в соматических и половых клетках [63] и другие эндогенные факторы.

Влияние радиационного воздействия на формирование генетических нарушений в популяциях сосны обыкновенной. На территориях, загрязнённых в результате аварии на Чернобыльской АЭС, был проведён ряд исследований

генетических нарушений в популяциях сосны обыкновенной. Исследователи рассматривали широкий спектр вопросов, начиная от проблемы интенсивности мутационных процессов, индуцированных радиоактивным загрязнением, и заканчивая цитогенетическими аспектами радиационного воздействия. Также были проведены работы по выявлению микроэволюционных изменений в потомстве облучённых сосен в зависимости от плотности радиоактивного загрязнения и мощности дозы излучения [69].

Цитогенетические исследования проростков семян сосны, собранных в 1986 и 1987 гг. в насаждениях, подвергшихся облучению в дозах от 0.1 до 10 Гр, показали [69], что количество клеток с аберрациями хромосом превышало контрольные значения в 1.5–7 раз, в зависимости от плотности радиоактивного загрязнения. К 1997 г. показатели основных биологических параметров семян приблизились к контрольным. При дополнительном облучении семян из насаждений сосны, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, выявлен эффект радиоадаптации [69]. На территории Восточно-Уральского радиоактивного следа было обнаружено [140] повышение частоты аберраций хромосом в мейозе и первом митозе проростков семян, снижена пролиферативная активность клеток, обнаружена аномальная пыльца.

Поскольку развитие семян происходит в течение двух лет, даже при низких дозах хронического облучения накапливается достаточное количество повреждений ДНК. При анализе частоты аберраций хромосом в меристеме корня проростков семян регистрируются нарушения хромосом, возникшие в период времени от образования гамет – оплодотворения – развития эмбриона до созревания и сбора семян, поскольку все хромосомные перестройки, возникшие на вегетативной стадии роста – до цветения, элиминируются в мейозе, за исключением симметричных транслокаций и инверсий, которые не регистрируются анафазным методом [141].

При длительном воздействии малых доз на популяции сосны обыкновенной наблюдается не только повышенная частота цитогенетических нарушений, но и мутаций в ферментных локусах, изменение генетической структуры семенного

потомства, возрастание устойчивости семян к острому облучению [15, 21, 57]. По данным [54], хроническое облучение с мощностью дозы, которая в 100 раз меньше принятой за безопасную для сосны на основе анализа соматических эффектов [110], индуцирует мутации в аллозимных локусах с частотой, превышающей контрольный уровень в 3.6 раза.

На соснах, облучённых после аварии на Чернобыльской АЭС, были также обнаружены замена радиочувствительных клеток более радиорезистентными клетками [58], эпигенетическая изменчивость, то есть изменения в спектре функционально активных генов [259], гиперметилирование ДНК [193, 248].

В ходе долгосрочного (2003–2018) исследования биологических эффектов в популяциях сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия, частью которого является настоящая работа, было показано, что частота аберрантных клеток в корневой меристеме проростков семян значимо превышала контрольный уровень в течение десяти лет исследования [23] и увеличивалась с ростом радиационной нагрузки – содержанием ^{137}Cs и ^{90}Sr в шишках, удельной активностью ^{137}Cs в почве и расчётными значениями поглощённой дозы в генеративных органах сосны, – что свидетельствует в пользу радиационной природы наблюдаемых изменений [129]. Однако более высокая частота мутаций не повлияла на репродуктивную способность этих деревьев, которая в значительной степени определяется погодными условиями [22].

Проведённое в тех же популяциях исследование изоферментного полиморфизма показало [15, 175, 247], что увеличение радиоактивного загрязнения участков ведет к статистически значимому росту частоты мутаций изоферментных локусов, а также таких показателей, характеризующих генетическую структуру популяции, как индекс внутрипопуляционного разнообразия, частота редких морф и эффективное число аллелей.

Так, в работах [15, 50] была оценена частота трёх типов мутаций изоферментных локусов – нуль-аллелей, дупликаций и изменений электрофоретической подвижности. Из полученных результатов следует, что частота нуль-мутаций в эндоспермах семян значимо превышала контрольный

уровень на всех экспериментальных участках и росла с увеличением поглощённой генеративными органами растений дозы. Аналогичным образом изменялся и индекс генотипического разнообразия в изучаемых популяциях. Для исследованных популяций также характерна [15, 50] повышенная по сравнению с контролем гетерозиготность и превышение наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой, что свидетельствует о селективном преимуществе гетерозигот в условиях хронического облучения. Выявленный в данных исследованиях высокий уровень мутационной изменчивости является предпосылкой к ускорению микроэволюционных процессов в исследуемых популяциях.

На данных участках показано, что гиперметилированным может быть и геном сосен, выросших в условиях хронического облучения [248], а не только деревьев, получивших значительные дозы в первый период после Чернобыльской аварии [193]. Анализ транскриптома экспериментальных деревьев показал, что генетическая экспрессия в изучаемых популяциях значительно детерминирована уровнями радиоактивного загрязнения на участках [165].

Результаты полевых исследований экспериментальных популяций сосны позволяют сделать вывод, что даже при относительно невысоких уровнях длительного радиационного воздействия наблюдается увеличение частоты мутаций в изоферментных локусах, гиперметилирование генома, изменения экспрессии генов, модификация эколого-генетической структуры популяций, причём с возрастанием радиационной нагрузки степень изменений увеличивается.

1.3 Состояние хвои сосны обыкновенной в условиях техногенного воздействия

Состояние хвои является ценным биоиндикационным показателем, способным выявить ранние проявления действия стрессовых факторов до их отображения на популяционном уровне. Изменения на органном уровне организации растений в условиях техногенного загрязнения проявляются

визуально в виде изменений окраски (хлорозы, побурение, покраснение и др.), некроза листьев, замедления их роста, преждевременного старения и опадения.

По мере увеличения аэротехногенной нагрузки в сфагновых сосняках происходит значительное изреживание крон деревьев вследствие развития хлорозов и некрозов, снижение густоты охвоения побегов [9, 80].

При возрастании уровня загрязнения окружающей среды выявлено уменьшение толщины кутикулы у хвои сосны, отмечено увеличение диаметра смоляных ходов, а также их количества, что связано с их функцией выведения токсических веществ. Под воздействием техногенных выбросов происходит снижение эффективности деятельности ассимиляционного аппарата, отмечаются видимые и скрытые нарушения ассимилирующих органов [35, 109]. В.В. Тужилкина с соавт. [127] отмечают, что поллютанты способствуют ослаблению процессов хлорофиллонакопления в ассимиляционной ткани, вызывают определённые перестройки в структуре клеток мезофилла, которые приводят к существенным нарушениям процессов метаболизма у деревьев. С увеличением загрязнённости воздуха в сосновой хвое отмечается увеличение количества кальция, магния, натрия, с одной стороны, обусловленное присутствием их в составе промышленных выбросов, а с другой – усилением процессов, связанных с детоксикацией поступающих элементов-поллютантов [8]. Несколько иная тенденция отмечается в динамике содержания в хвое сосны калия, марганца и, отчасти, фосфора – в условиях промышленного загрязнения количество этих элементов уменьшается [8]. С ухудшением жизненного состояния насаждений в хвое сосны снижается число макроэргических соединений, сахарофосфатов, зелёных пигментов и увеличивается число неорганического фосфора, крахмала и глюкозы [120].

Уменьшение размеров длины хвои – обычная адаптивная реакция на ухудшение условий внешней среды. Длина хвои сосны заметно варьирует в зависимости от индивидуальных особенностей того или иного дерева [103]. В целом изменчивость хвойных видов по данному признаку недостаточно изучена. Изменения размеров хвои сосны в большой мере неспецифичны [10]. Так, под

действием нитрата хвоя удлиняется, а под действием SO_2 – укорачивается. Соединения серы отрицательно влияют на размеры хвои и листовых пластинок [96, 108] из-за торможения стадии растяжения клеток [4]. В зоне действия азотсодержащих соединений размеры и масса хвоинок могут увеличиваться, а в отдельных случаях наблюдается даже гигантизм [7].

При внешнем облучении в острый период радиационной аварии наибольшие удельные поглощённые дозы в лесных насаждениях приходятся на листовой аппарат деревьев. Хвоя сосны более устойчива к облучению, чем почки, камбий и репродуктивные органы [121]. Однако при остром облучении в зонах летального и сублетального поражения в районе аварии на ЧАЭС, хвоя сосны оказалась частично некротированной уже при поглощённых дозах 8–10 Гр [65], хотя по наблюдениям Р.П. Пономаревой [101] воздействие гамма-облучения проявляется на зрелой хвое сосны только при дозах свыше 20 Гр. По довольно многочисленным данным, как острое, так и хроническое облучение приводит к частичному или полному опадению хвои на молодых побегах, уменьшению её размеров, появлению густохвойных укороченных побегов, снижению содержания хлорофилла и пожелтению хвои [121, 238].

Хвоя, сформировавшаяся в 1986 г. в районе Чернобыльской аварии, отличалась уменьшенными размерами. В 1987–1988 гг. встречались крупные хвоинки, достигающие 12-14 см длины с тремя проводящими пучками и сильно разросшейся эндодермой. В данной хвое вокруг смоляных каналов и в проводящем цилиндре обнаружены многочисленные тяжи клеток гиподермы с особенно утолщёнными стенками. В мезофилле наблюдаемой гигантской хвои в зоне, прилегающей к эндодерме, достаточно часто имелся второй ряд меньших смоляных каналов [70]. При этом хвоя 1987 г. была в 2.5–3 раза длиннее хвои 1986 г. [69].

Имеющиеся литературные данные о влиянии ионизирующего излучения на пигменты пластид неоднозначны. В большинстве обзорных работ отмечается высокая радиоустойчивость хлорофилла [28]. В то же время пожелтение и некроз хвои сосны в районе аварии на ЧАЭС наблюдались в некоторых случаях уже при

дозах 5–10 Гр [64, 65]. По всей вероятности, при облучении хвои прежде всего разрушается мембранная система хлоропластов, что, в свою очередь, приводит к деструкции фотосистем и молекул хлорофилла [69].

Помимо указанных выше характеристик, состояние хвои *Pinus sylvestris* L. может быть оценено по индексу флуктуирующей асимметрии, изменения которого отражают нарушения морфогенетических процессов в организме.

1.4 Флуктуирующая асимметрия в условиях техногенного воздействия

Техногенное влияние на популяции может быть оценено на уровне онтогенеза – по состоянию особей, характеризуемому стабильностью развития. Под стабильностью или гомеостазом развития понимают способность генотипа создавать определённый фенотип в широком диапазоне условий. В последнее время для оценки стабильности развития организмов наряду с физиолого-биохимическим подходом активно применяется морфологический подход. При этом характеристику стабильности развития даёт величина флуктуирующей асимметрии (ФА) различных признаков животных и растений.

Согласно классификации [245], существует три типа асимметрии, выделяемые на основании разных критериев, – первый по направленности, второй по взаимосвязи между сторонами, третий по причинной обусловленности.

1) Направленная асимметрия – явление, при котором в норме какая-то структура развита на одной определённой стороне больше, чем на другой. В качестве примера обычно приводится сердце млекопитающих; большее развитие у одних крабов левой клешни, у других – правой; наличие лево- или правосторонней асимметрии в строении тела камбалообразных или закрученности раковины у брюхоногих моллюсков [245].

2) Антисимметрия характеризуется большим развитием структуры то на одной, то на другой стороне тела, что соответствует отрицательной связи проявления признака на разных сторонах тела. Классификация [245] приводит в качестве примера левшей и правшей в популяциях человека.

3) Флуктуирующая асимметрия представляет собой незначительные ненаправленные отклонения от строгой билатеральной симметрии [217]. История исследований ФА подробно рассмотрена в обзоре Д.Л. Лайуса с соавт. [77].

Флуктуирующая асимметрия – наиболее доступная и широко применяемая морфогенетическая мера нарушения стабильности развития (developmental stability), являющейся результатом сочетанного действия шумов развития и стабильности развития [244]. Развитие любых признаков сопровождается случайными стохастическими процессами вдоль траектории развития (так называемые шумы развития), и могут существовать процессы, которые являются буфером развития признаков против разрушений (то есть стабильность развития). «Шумы развития» – случайные факторы, которые могут быть обусловлены мелкими случайными различиями в скоростях деления клеток, их роста, физиологии и изменения формы, а также влиянием температуры на энзиматические процессы; факторами среды и факторами наследственной природы. Стабильность развития ограничивает уровень потенциальной асимметрии индивида в соответствующих условиях среды [17]. Вследствие взаимодействия обоих процессов реальный фенотип отличается от ожидаемого, обусловленного генотипом вида, и является следствием влияния окружающей среды в период развития.

Первые работы, в результате которых были обнаружены повышенные значения ФА у различных организмов из нарушенных местообитаний, послужили основой для многочисленных рекомендаций использовать ФА для индикации уровней стресса, испытываемого растениями и животными [42, 171]. В России эти рекомендации получили силу руководящего документа [85].

На сегодняшний день ФА показала свои возможности в экологическом мониторинге как чувствительный популяционный индикатор средового стресса различной этиологии (антропогенное воздействие, пищевой, температурный стресс и другие) [242]. По данным Е.Г. Шадриной и соавт. [137] высокая ФА у мелких млекопитающих (полёвка, бурозубка) и разнообразных видов растительности отмечена в условиях интенсивного влияния горнодобывающих

отраслей промышленности (отвал, дренажные полигоны и т.д.) Якутии. Зарегистрировано увеличение уровней асимметрии листовых пластин у двух видов берёзы *Betula pendula* и *B. pubescens* вдоль склонов недалеко от плавильных и бумажных фабрик в Финляндии и России [243]. В ряде исследований была показана связь между морфологической асимметрией дрозофилы и расстоянием от стоков химических фабрик [217]. Приведённые примеры демонстрируют достаточное разнообразие объектов исследования для определения влияния химического загрязнения как в натурных, так и в модельных исследованиях с помощью анализа ФА.

Особый интерес вызывает работа, проведённая на территории города Москвы [41], в которой показана скоррелированность изменений показателей ФА у различных видов живых организмов с уровнем антропогенного воздействия. Анализу подвергались растения (берёза повислая), рыбы, земноводные, мелкие млекопитающие. Оценка состояния наземных экосистем с использованием берёзы и мышевидных грызунов выявила сходную реакцию на антропогенное воздействие – повышение асимметричности. На показатель ФА растений в городской среде большое влияние имеет величина транспортной нагрузки, расстояние от источника загрязнения, открытость и защищённость участка, качество дороги.

Показатель ФА, как отражение общего состояния организма, должен коррелировать с другими (иммунологическими, цитогенетическими и физиологическими) показателями гомеостаза развития. Некоторые мутагены, например, нитрозометилмочевина (НММ), воздействие которой приводит к увеличению уровня аберраций хромосом и генных мутаций, одновременно вызывают рост асимметрии [2]. Заслуживает внимания тот факт, что при регистрации как уровня аберраций хромосом, так и ФА листьев пшеницы наблюдается примерно одинаковое увеличение изменчивости [2]. Это свидетельствует о том, что при воздействии мутагенов нарушения генерационных и регуляционных функций генетического аппарата возникают примерно с

одинаковой вероятностью, и показывает возможность использования теста ФА для скрининга средовых генотоксикантов.

Нарушения стабильности развития на всех уровнях, в том числе и морфогенетическом, отмечены при исследовании покрытосеменных растений, рыб, амфибий, мелких млекопитающих в Брянской области в зоне действия последствий Чернобыльской катастрофы, на территории химических предприятий на юге Украины и в Новгородской области, в долине Нижней и Средней Волги [42, 76, 102]. Обнаружено, что радиоактивное загрязнение может увеличить уровень ФА в популяциях желтогорлых мышей (*Apodemus flavicollis*), живущих вблизи Чернобыльской АЭС; при этом выявлено увеличение средней асимметрии черепа по сравнению с контрольной популяцией в 3.6 раза в диапазоне доз от 0.1 до 4.1 мкГр/ч [226]. Высокая степень ФА была зарегистрирована у пресноводного моллюска речной дрейссены (*Dreissena polymorpha* Pall.) и рдеста плавающего (*Potamogeton natans* L.) из водных систем Чернобыльской зоны отчуждения [255].

Для разных видов растений было показано, что, помимо техногенного воздействия, ФА зависит от погодных условий (температуры, осадков), почвенных условий (плодородия, влажности, засоленности, загрязнения), биотического окружения (типа сообщества, уровня конкуренции, освещённости), предшествующего повреждения животными (обгрызания коры и побегов, объедания листьев) и многих других характеристик окружающей среды [171, 177, 198, 217, 243]. Кроме того, ФА зависит от генетической структуры популяции, возрастая при гибридизации [149, 253].

С другой стороны, далеко не всегда отсутствие изменений ФА можно рассматривать как доказательство отсутствия стресса [150]: у некоторых видов асимметрия не возрастает даже при очень высоких уровнях промышленного загрязнения [199] и других экологических стрессах [177]. Так, радиационное облучение не оказало существенного влияния на ФА крыльев болотного кузнечика (*Chorthippus albomarginatus*) и существенно не изменило успех их вылупления и плодовитость в Чернобыльской зоне отчуждения при мощности дозы 50 мкГр/ч [153].

Тем не менее, показатели ФА представляют собой характеристику реакций на внешние стрессовые факторы, отличаются высокой информативностью и могут быть использованы в биоиндикационных исследованиях в условиях техногенного загрязнения.

1.5 Пыльца в качестве тест-объекта биоиндикации

Эколого-генетический мониторинг окружающей среды нуждается в разнообразном наборе тестовых систем, позволяющих наиболее полно и эффективно исследовать отклики биоты на хроническое воздействие тех или иных антропогенных факторов.

Ещё в 90-х годах прошлого столетия установлено, что, изучая строение пыльцевых зёрен, можно не только выявлять наличие гаметопатогенных соединений в окружающей среде, но и давать сравнительную оценку загрязнённости ими разных регионов и отдельных зон в их пределах [166], поскольку процессы формирования и развития пыльцы очень чувствительны к воздействию факторов окружающей среды различного генезиса; данный метод отличается простотой анализа, возможностью одновременного оперативного обследования большого числа индивидуальных особей (гамет), что придаёт данной тест-системе особенно высокую информативность.

При изучении реакции мужского гаметофита на воздействие внешних факторов возможно определение оплодотворяющей способности (фертильности) и жизнеспособности пыльцы, морфометрических показателей пыльцы (длины и высоты тела и воздушных мешков), морфологический анализ (отношение длины пыльцевого зерна к высоте), оценка аномалий пыльцы и пыльцевых трубок, проведение гистохимического теста на крахмал, измерение энергии прорастания пыльцы, изучение изменения структуры оболочек.

Таким образом, пыльца растений является важнейшим источником экологической и генетической информации. Часто мутации в гаметах и зародышевых клетках родительских организмов, обусловленные факторами

внешней среды, не элиминируются, а входят в состав мутационной компоненты генетического груза данного и последующих поколений, снижая их жизнеспособность и изменяя генофонд популяций [106, 215].

Пыльца *Pinus sylvestris* L. У сосны обыкновенной процесс формирования микроспорофиллов заканчивается во второй половине лета, процессы микроспорогенеза и формирования пыльцы протекают весной следующего года: при повышении среднесуточных температур в результате высокой митотической активности клетки археспория дифференцируются, в микроспороцитах идут мейотические деления, формируются пыльцевые оболочки, микроспоры претерпевают три проталлиальных деления [94]. Начинается прорастание микроспор уже в микроспорангиях, и зрелая пыльца рассеивается на четырёх клеточной стадии, после формирования двух вскоре отмирающих проталлиальных, одной вегетативной и одной генеративной клеток. Вегетативная клетка образует пыльцевую трубку. Генеративная клетка делится на две: стерильную клетку и сперматогенную клетку, которая даёт начало двум мужским гаметам. Сосне для начала мейоза требуется количество накопленного тепла, которое соответствует 5.0–6.0% от средней годовой температуры; для вылета пыльцы – 14.5–16.5%; оплодотворения – 27.0–29.0% [38, 111]. Отмечено, что в Подмосковье длительность мейоза составляло 4–5 сут; пыление наступало через 2 недели после мейоза [133]. Дальше мужской гаметофит развивается уже в семяпочке, образуя два спермия.

Эмбриологами отмечено, что развитие женского гаметофита стимулируется только пыльцой, прорастающей на нуцеллусе семяпочки; при отсутствии опыления и оплодотворения семяпочки сосны обыкновенной дегенерируют [62, 106]. Важной причиной отсутствия опыления и оплодотворения семяпочек сосны и ухудшения посевных качеств семян является сниженное качество пыльцы. Биологическая роль пыльцы при половом процессе, уязвимость процессов микрогаметогенеза к воздействию внешней среды определяют актуальность изучения мужской генеративной системы хвойных растений, в особенности при неблагоприятных условиях произрастания.

Влияние промышленности на качество пыльцы. Реакция пыльцы на действие физических и химических факторов может быть различна. В работе [74] установлено, что УФ-радиация ускоряет микроспорогенез и развитие пыльцевых зёрен, которые сопровождаются возрастанием гетерогенности пыльцевых зёрен и увеличением их стерильности. Имеются указания на то, что при низкой относительной влажности пыльца сосны может быть толерантной к воздушным загрязнителям [178].

К загрязнителям среды относят диоксид серы, хлор, фенол, оксиды азота, оксид углерода, тяжёлые металлы и т.д., которые оказывают сильное влияние на различные стороны метаболизма растений, в том числе микроспорогенез [29]. На генеративное развитие растений, в том числе сосны, влияет близкое расположение к алюминиевым заводам [78, 215], горно-обогатительным комбинатам [18], стоянкам транспорта и автодорогам, зонам свалки твёрдых бытовых отходов [46].

В своей работе О.Ф. Дзюба [32] изучала 40 видов растений и определила, что у всех них под влиянием промышленных эмиссий изменяются размеры и форма пыльцевых зёрен, количество, очертания и тип апертур, их размеры и расположение относительно друг друга. Главное, изменяются самые стабильные структуры пыльцевых зёрен – скульптура поверхности спородермы, а также количество и толщина её слоёв.

Способность прорастать и формировать пыльцевые трубки у пыльцы из районов с повышенной техногенной нагрузкой закономерно уменьшается по градиенту загрязнения, это в особенности заметно в благоприятные для репродукции вида годы. Установлено, что отрицательное воздействие воздушных поллютантов на жизнеспособность пыльцы усиливается в период выпадения туманов и кислых дождей [126].

У пыльцевых зёрен сосны под действием аэрополлютантов может наблюдаться набухание и возникновение зернистости цитоплазмы в районе апертуры. Проросшие пыльцевые зёрна формируют короткие пыльцевые трубки не более 15–45 мкм в длину, как правило, с развитым каллозным слоем,

располагающимся пристеночно и сдавливающим цитоплазму, что затрудняет выход ядра вегетативной клетки и генеративной клетки в трубку и препятствует дальнейшему росту трубки и развитию гаметогенеза [78].

С другой стороны, по данным С.Г. Махневой [82], структура взаимосвязей показателей фертильности и жизнеспособности пыльцы сосны не зависит от уровня техногенного загрязнения, что свидетельствует о жесткой генетической детерминированности данных показателей. Изменения структуры взаимосвязи других показателей (степени развития на препаратах пыльцы грибного мицелия и жизнеспособности пыльцы; содержания в пыльце крахмала и липидов) в условиях техногенного загрязнения могут иметь адаптивное значение, обеспечивая определённый уровень жизнеспособности пыльцы деревьев и популяции в целом, но могут также свидетельствовать о дезинтеграции свойств мужской генеративной системы.

Влияние радиации на состояние пыльцы сосны. Пыльца растений – очень удобный объект для радиобиологических исследований. Пыльцевые зёрна можно облучать в вакууме, изучая действие ультрафиолетового и синхротронного излучения, протонов и дейтронов, а также ядер тяжёлых элементов. Благодаря небольшим размерам пыльцевого зерна, даже корпускулярное излучение с очень малым пробегом частиц может проникать внутрь клеток. Размер пыльцы варьирует для разных видов растений от 10 до 200 мкм, мелкая пыльца более радиоустойчива в соответствии с принципом попадания. Кривые выживаемости пыльцы имеют сигмоидный характер [28].

Репродуктивные органы отличаются, как правило, меньшей устойчивостью к ионизирующему излучению по сравнению с вегетативными. Одной из причин этого явления могут быть большие размеры ядра и хромосом в профазе мейоза и более продолжительный мейоз по сравнению с митозом, что делает ядро в стадии мейоза относительно более чувствительным к ионизирующей радиации.

В опытах с облучением пыльцы продемонстрированы различия радиоустойчивости отдельных процессов: очень высока радиоустойчивость прорастания пыльцы и рост пыльцевой трубки, однако крайне мала

радиоустойчивость клеточных ультраструктур, от которых зависят митоз и оплодотворение [28].

Рядом авторов проводились исследования состояния пыльцы сосны в условиях Чернобыльской аварии. Из работ Г.М. Козубова и А.И. Таскаева [69] следует, что молодые микро- и макростробилы сосны в период острого облучения весной 1986 г. погибли на всех участках, поглощённые дозы на которых превышали 2.5–4 Гр. Весной 1987 г. пыление сосны было обнаружено только на участках с дозами не более 2.5–3.0 Гр и на единичных деревьях при 5–8 Гр. В 1988 г. при поглощённых дозах от 0.7–1.2 до 5–8 Гр наблюдалось уже устойчивое пыление в основном в верхней части кроны, со смещением мужского яруса вверх по кроне. В 1989 г. цветение среднего обилия наступило уже на границах сублетальной и летальной зон, и на участках с поглощёнными дозами 20–25 Гр.

В 1991–1992 гг. сотрудники Института леса АН Беларуси [48] исследовали особенности развития мужских репродуктивных органов в насаждениях сосны с плотностью загрязнения радиоцезием от 37 до 11500 кБк/м^2. Полученные авторами данные показали, что при максимальной плотности радиоактивного загрязнения размер пыльцевых зёрен значимо уменьшался.

При изучении последствий аварии Чернобыльской АЭС на территории Брянской области [119] выявлено, что увеличение мощности экспозиционной дозы (МЭД) вызывает сложные аномалии пыльцевых трубок (с 2-мя, 3-мя и более разветвлениями, зёрен с 2-мя трубками без разветвлений и с разветвлениями). Выделяют ветвление пыльцевых трубок у сосны обыкновенной по типу «ёлочки» и «оленьих рогов».

А.В. Скок с соавт. [113] отмечали, что увеличение МЭД повышает уровень внутрипопуляционной изменчивости жизнеспособности пыльцы. Повышение уровня изменчивости признака, как правило, связано с индукцией ионизирующей радиацией у растений мутационных повреждений, для которых повышенная изменчивость закономерна [30, 159].

При радиоактивном загрязнении количество аномалий у сосны обыкновенной достигает наибольших значений в анафазе I (отставание хромосом

и их фрагментация, мосты, агглютинация хромосом) и в анафазе II (в основном агглютинация хромосом) [119]. При этом частота хромосомных аномалий в процессе мейоза не всегда коррелирует с общей поглощённой дозой [69]. Чёткая связь между средней длиной пыльцевой трубки и различными аномалиями их развития у сосны с мощностью экспозиционной дозы также не всегда может быть выявлена [113].

Таким образом, влияние радиационного воздействия на пыльцу неоднозначно, а в условиях хронического облучения малыми дозами практически не изучено, поэтому подобная тема исследований является актуальной и представляет научный интерес.

1.6 Оценка генетического полиморфизма ДНК в популяционно-генетических исследованиях

Анализ генетического разнообразия. Прогресс в современной биологии в значительной степени основывается на развитии и использовании молекулярно-генетических подходов, одним из которых является анализ полиморфизма ДНК, определяемый различными типами молекулярных маркёров.

Наличие в популяции двух или более вариантов данного признака называют полиморфизмом, если их частота превышает частоту возникновения мутаций. Если речь идёт о генетически детерминированных вариантах признака, то его называют генетическим полиморфизмом. В прикладных популяционных исследованиях признак считают полиморфным, если частота наиболее распространённого варианта не превышает условно выбранной границы (0.95 или 0.99); в противном случае его относят к мономорфным [40].

Первоначально основной причиной возникновения полиморфизма ДНК считались точковые мутации (а также микроделеции и инсерции), затрагивающие сайты узнавания тех или иных эндонуклеаз рестрикции [158]. В последующих работах спектр возможных причин был расширен, и в настоящее время основная роль отводится таким факторам, как крупные делеции и вставки [250],

трансверсии, транслокации, транспозиции мобильных генетических элементов [235] и т.п.

Сначала в качестве генетических маркёров применялись морфологические (фенотипические) признаки, например, с использованием маркёров этого типа построена первая генетическая карта *Drosophilla melanogaster*. Однако количество информативных маркёров этого типа ограничено. К тому же фенотипические признаки могут иметь сложный характер наследования и часто зависят от условий внешней среды [118].

Начиная с 50-х годов XX столетия, для определения генетического полиморфизма стал широко применяться метод электрофореза белков (в том числе и ферментов) в геле. Этот метод позволяет разделить смесь белков в электрическом поле в зависимости от их размера, конфигурации и суммарного заряда. Применение белковых маркёров позволяет по электрофоретическим спектрам полиморфных белков проводить анализ морфологически однородной популяции. С помощью нескольких сотен биохимических маркёров был оценён уровень генетического полиморфизма свыше 2-х тысяч видов (от микроорганизмов до человека) и разработаны основные положения популяционной генетики. Преимущества изоферментных маркёров состоят в их низкой стоимости, технической простоте проведения анализа и их кодоминантной природе, что позволяет отличать гомо- и гетерозиготы друг от друга. Но существуют ограничения в применении биохимических маркёров. Прежде всего, анализ белков позволяет исследовать полиморфизм только белок-кодирующих последовательностей и только у экспрессирующихся генов. При этом из анализа исключаются такие функционально значимые участки, как промоторные области, различные сайты регуляции, расположенные в интронах (нетранслируемых областях генов), а также вне генов, часто на значительном расстоянии от кодирующей последовательности [118]. К тому же зимограммы многих ферментов имеют органную, тканевую и субклеточную специфичность, также возможны изменения в спектре изозимов по фазам развития организма и под

влиянием таких факторов, как температура, фотопериод, инфекция и условия питания растений [71, 72].

В современном мире перспективнее изучение полиморфизма на уровне ДНК, так как это позволяет тестировать генетический полиморфизм именно на уровне генов, а не на уровне продуктов генов, как при использовании метода белкового полиморфизма.

ДНК-маркёры обладают многими преимуществами: возможность тестирования любых последовательностей генома, повсеместность распространения, возможность анализа материнского и отцовского типа наследования, стабильность наследования, отсутствие плейотропного эффекта, множественность аллелей, информативность о природе генетических изменений, возможность проведения ретроспективных исследований, возможность определения в любых тканях и на любых стадиях развития, длительность хранения образцов ДНК, возможность использования гербарного материала или ископаемых остатков, отсутствие ограничений в числе маркёров на образец, наличие маркёров для белок-кодирующих, некодирующих и повторяющихся последовательностей [118].

Методы выявления полиморфизма ДНК. Изначально методов обнаружения полиморфизма ДНК на уровне последовательности было предложено три: рестрикционный анализ (применён в 1974 г.); полимеразная цепная реакция (ПЦР), открытая К. Мюллисом в 1983 г. (Нобелевская премия 1993 г.); и секвенирование, предложенное А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. (Нобелевская премия за 1980 г. совместно с Ф. Сенгером и П. Бергом).

Метод рестрикционного анализа базируется на способности ферментов рестрикции специфически разрезать ДНК в определённых сайтах. Различия в последовательности ДНК приводят к разрезанию ДНК ферментами рестрикции в разных местах [221]. Полученные с применением рестриктаз фрагменты ДНК используют в качестве маркёров различных процессов, происходящих внутри клетки исследуемого организма.

Вторым способом выявления полиморфизма ДНК на уровне последовательности является ПЦР. Метод ПЦР позволяет быстро и относительно не очень дорого получить многократное увеличение копий определённой последовательности ДНК, представленной в геноме в виде одного или нескольких фрагментов. Существует свыше двадцати разновидностей или модификаций ПЦР. Основные принципы полимеразной реакции и состав реакционной смеси для получения копий ДНК впервые были описаны K. Klepper с соавт. [189]. Однако исследователи не показали главную черту ПЦР – экспоненциальный рост количества копий фрагмента исходной ДНК. ПЦР – метод ферментативной наработки *in vitro* определённых, достаточно коротких (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) двуцепочечных фрагментов ДНК. Реакция основана на механизме, который в природе используется при репликации молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразой. Для протекания этой реакции (*in vivo* или *in vitro*) используются следующие компоненты: исходная молекула ДНК (служащая матрицей для репликации), дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, фермент ДНК-полимераза и короткие одноцепочечные ДНК-затравки (праймеры), комплементарные матричной ДНК. Если все перечисленные компоненты смешать в соответствующем солевом растворе (буфере), ДНК-полимераза будет синтезировать ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, подставляя их по принципу комплементарности к матричной молекуле ДНК начиная от ДНК-затравки [105].

Третий способ выявления полиморфизма ДНК – секвенирование. Секвенирование нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) представляет собой определение их нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы, представленное в текстовом виде последовательностью мономеров. Среди огромного числа методов анализа генетического разнообразия на молекулярном уровне секвенирование ДНК является наиболее точным методом по определению точечных и небольших по размерам мутаций или замены нуклеотидов.

Полиморфные последовательности ДНК, являющиеся основой молекулярных маркёров, используются для маркирования генов, участков хромосом, генома, особей, популяций и видов в решении различных задач. Одним из широко используемых типов ДНК-маркёров являются AFLP-маркёры.

Анализ полиморфизма ДНК методом AFLP. AFLP-маркёры (amplified fragment length polymorphism) позволяют оценить генетический полиморфизм при помощи изучения полиморфизма длины амплифицированных фрагментов. Метод AFLP широко используется для анализа популяционного полиморфизма, филогенетических отношений, идентификации видов, маркирования локусов, сцепленных с хозяйственно ценными признаками [187, 230, 236].

С момента своего появления, метод AFLP в первую очередь использовался для оценки внутривидового генетического разнообразия. Он был успешно применён для растений [210, 225], бактерий и грибов [188, 190], а также для беспозвоночных [164, 212] и позвоночных животных, в том числе рыб [211], птиц [251] и млекопитающих [170, 232].

Из-за высокого качества профилей, формируемых в полиакриламидном геле, а также большого числа полиморфных полос, получаемых при проведении AFLP анализа, AFLP исключительно популярен как метод выявления генетического разнообразия в исследованиях разных растений. В настоящее время данный подход достаточно часто применяют как один из источников маркёров для позиционного клонирования.

Метод AFLP используется для изучения генетического разнообразия и перспективен для построения генетических карт и у хвойных растений [148, 204]. Этот вид маркёров совместно с SNP-маркёрами применяется для картирования локусов количественных признаков у сосны обыкновенной [206]. В последние десятилетия были созданы генетические карты для многих видов сосен: *Pinus taeda* [167, 229], *Pinus radiate* [160, 219], *Pinus pinaster* [203, 231], *Pinus koraiensis* [161], *Pinus elliottii* [233, 254], *Pinus lambertiana* [182], *Pinus sylvestris* [205, 256].

Техногенное воздействие способно менять величину и структуру внутрипопуляционной изменчивости [5, 139], причём антропогенные факторы

могут вызывать изменения, не совпадающие с характером и темпами эволюционного развития видов. Эволюционная адаптация с помощью изменения генетической структуры в результате отбора, как полагают, является одной из основных реакций популяций в условиях экологического стресса. Многочисленные экспериментальные исследования предполагают адаптацию выборочными изменениями генетической структуры в популяциях растений, включая *Pinus edulis* [162, 216], *Pinus sylvestris* [228].

При радиоактивном загрязнении огромных территорий хроническое воздействие ионизирующего излучения является экологическим фактором, изменяющим генетическую структуру природных популяций. Это было показано в исследованиях на Восточно-Уральском радиоактивном следе и в зоне аварии на ЧАЭС [55, 56, 130, 141, 175, 247]. В подобных условиях особую актуальность приобретает, в том числе, и изучение адаптивных возможностей природных популяций. Например, в работах Kovalchuk et al. [193, 194] в исследованиях механизмов адаптации растений к выживанию в условиях радиоактивного загрязнения обнаружили более чем в 10 раз пониженный уровень рекомбинации и высокий уровень метилирования генома, что в совокупности позволяет снизить уровень нежелательных перестроек генома.

Проводимые исследования изоферментного полиморфизма на изучаемых в данной работе популяциях сосны в Брянской области показали, что увеличение радиоактивного загрязнения участков ведет к статистически значимому росту частоты мутаций изоферментных локусов и внутрипопуляционного разнообразия, изменению генетической структуры популяций [175]; также обнаружено, что на наиболее загрязнённых участках с более высоким вкладом β-излучения в годовую дозу наблюдается увеличение концентрации антиоксидантов и более высокий уровень окислительного стресса по сравнению с контрольными участками [247].

Указанные работы о влиянии ионизирующего излучения на генетическую структуру природных популяций проводили, используя метод оценки биохимического полиморфизма. Учитывая, что белок-кодирующие последовательности у высших эукариот составляют лишь небольшую часть

генома, получается, что основная его часть ускользает от внимания исследователей. ДНК-маркёры же позволяют решить проблему насыщения генома маркёрами и маркировать практически любые участки ДНК, в том числе некодирующие, к тому же давая возможность использовать для анализа любые ткани и органы, независимо от стадии развития организма. Данные по ДНК-полиморфизму у сосен, произрастающих в условиях хронического радиационного воздействия не столь многочисленны [200]. Анализ ДНК-полиморфизма способен значительно расширить и углубить понимание адаптации популяций к радиационному воздействию. Подобные исследования дают реальную основу для прогнозирования отдалённых популяционно-генетических последствий хронического облучения, предсказания характера индуцированной микроэволюции.

Таким образом, анализ литературных данных различных радиобиологических, экологических и генетических исследований показывает необходимость комплексного подхода к оценке состояния природных сообществ. Сосна обыкновенная является уникальным, широко распространённым радиобиологическим объектом исследования, который обладает разнообразными информативными и чувствительными тест-системами на разных уровнях организации. Многие работы на популяциях сосны продемонстрировали влияние радиоактивного загрязнения разной интенсивности на формирование нарушений на всех уровнях организации сообщества: от генетического до популяционного. Тем не менее, в данной работе использованы новые методы оценки состояния природных популяций, обитающих в условиях хронического облучения, основанные на комплексном анализе морфометрических показателей хвои, аномалий пыльцы и параметров генетического полиморфизма ДНК.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

В настоящей работе изучали популяции сосны, расположенные в одних из наиболее пострадавших районов России и Беларуси. На юго-западе Брянской области исследования проводили с 2011 по 2016 гг. на 4-х участках в наиболее загрязнённых Новозыбковском, Клинцовском и Красногорском районах, а также на 2-х контрольных участках (К и К1), расположенных в Выгоничском и Унечском районах Брянской области (рис. 2). Использование двух контрольных участков обусловлено необходимостью учёта пространственной гетерогенности среды обитания популяций [16]. Экспериментальные участки в окрестностях Всероссийского научно-исследовательского института удобрений и агропочвоведения (ВИУА), с. Старые Бобовичи (СБ) и д. Заборье (ЗП и ЗК) расположены на расстоянии 200–250 км северо-восточнее ЧАЭС. На территории Полесского Государственного радиационно-экологического заповедника (ПГРЭЗ) в 2015–2016 гг. исследовали ещё 3 экспериментальных участка, находящихся в Хойникском и Брагинском районах Гомельской области Республики Беларусь. Реперные площадки вблизи бывших населенных пунктов (бнп) Кожушки (Кож), Кулажин (Кул), Масаны (Мас) расположены на расстоянии 12–45 км от ЧАЭС (рис. 2).

2.2 Радиоэкологическая обстановка на экспериментальных участках

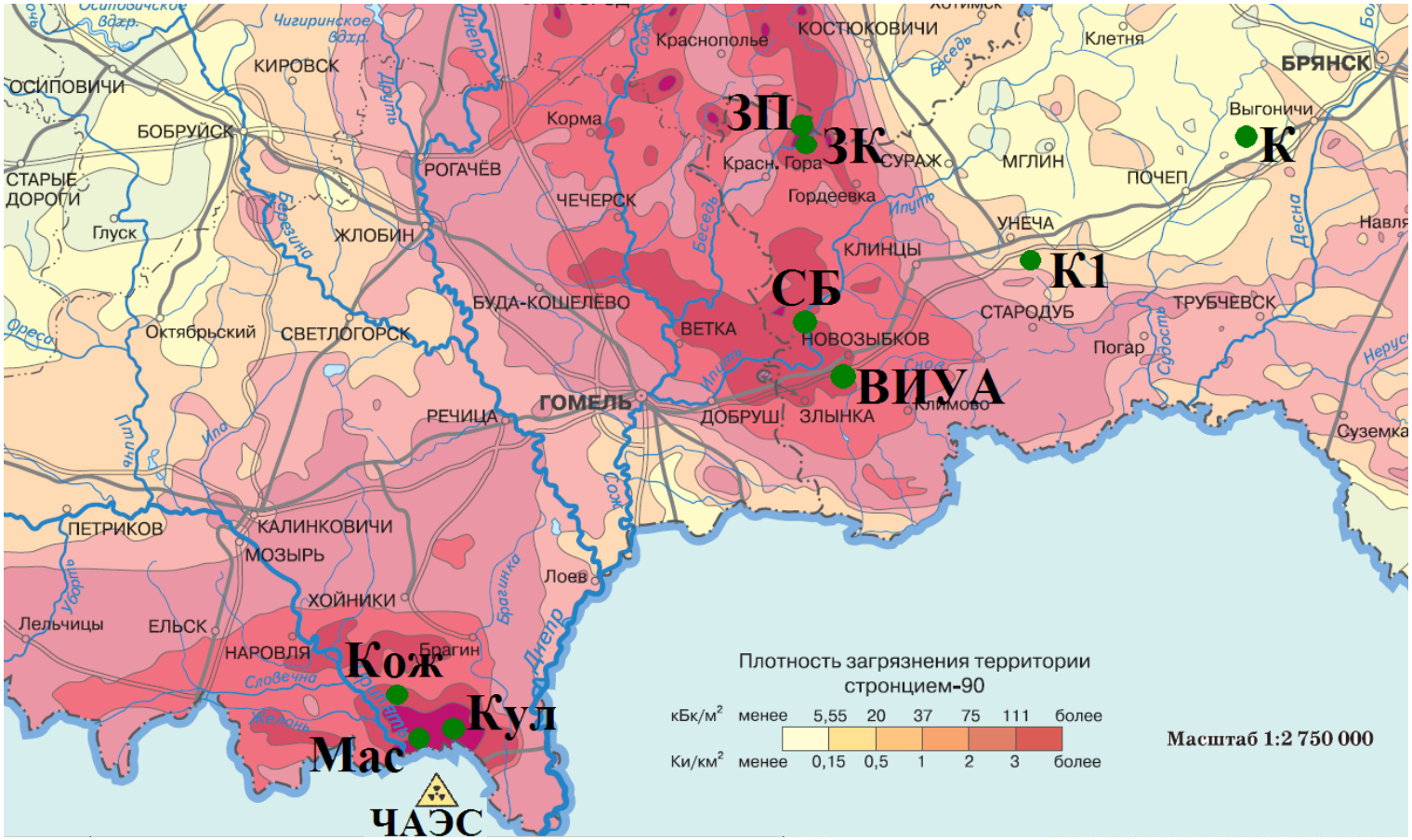

Рисунок 2 – Расположение экспериментальных участков, на основе карты [6]

На экспериментальных площадках ежегодно измеряли МЭД дозиметром ДРГ-01Т на высоте 1 м от поверхности почвы, по 5–7 измерений под каждым деревом, с которого собирали материал. Описание местонахождения исследуемых участков представлено в табл. 1.

Таблица 1 – Описание экспериментальных участков

Участок	Расположение	МЭД 2010–2016 гг., мкР/ч
К (контроль)	В 4 км от пос. Алексеевский (Выгоничский район), с. ш. 53º 1' 9.2", в.д. 33º 55' 5.0"	9.6–10.2
К1 (контроль)	В 1 км от н.п. Найтоловичи (Унечский район), с. ш. 52º 46' 13.4", в.д. 32º 39' 34.8"	9.1–11.5
ВИУА	В 1–2 км от с. Деменка (Новозыбковский район), с. ш. 52º 29' 54.4", в.д. 31º 50' 42.3"	34.0–40.3
СБ	В 7 км от с. Старые Бобовичи (Клинцовский район), с. ш. 52º 33' 52.9", в.д. 31º 44' 21.7"	40.0–47.6
ЗП	В 2–4 км от д. Заборье (Красногорский район), с. ш. 53º 5' 5.8", в.д. 31º 42' 28.3"	123.3–176.1
ЗК	В 1–2 км от д. Заборье (Красногорский район), с. ш. 53 º5' 11.3", в.д. 31º 42' 10.3"	91.4–119.9
Кож	В 3 км от бнп Кожушки (Хойникский район), с. ш. 51º 40' 53.7", в.д. 29º 47' 42.1"	33.9
Кул	В 3 км от бнп Кулажин (Брагинский район), с. ш. 51º 34' 12.8", в.д. 30º 10' 11.0"	359.1
Мас	В 0–1 км от бнп Масаны (Хойникский район), с. ш. 51º 30' 43.0", в.д. 30º 1' 7.2"	263.0

Примечание. В таблице показан диапазон средних значений МЭД; на площадках Кож, Кул, Мас средние значения только за 2016 г.

Для отбора проб почвы на реперных площадках использовали модифицированный бур Малькова с ракрывающимся цилиндром длиной 20 см и внутренним диаметром 4 см. Каждый из нескольких уколов разделяли по слоям 0–5, 5–10 и 10–15 см и объединяли в смешанную пробу послойно. Образцы почвы высушивали до воздушно-сухого состояния и измельчали. По экспериментальным площадкам Брянской области удельную активность ^{137}Cs, ^{40}K, ^{226}Ra и ^{232}Th в почвенных пробах определяли в 2008 г. методом γ-спектрометрии с использованием многоканального IN-1200 анализатора (Франция) с германиевым детектором GEM-1200 (США), также ^{137}Cs определяли с помощью гамма-спектрометра производства CANBERRA Packard (США) с коаксиальным полупроводниковым детектором Ge(Li) расширенного энергетического диапазона. Минимально измеряемые активные концентрации для часовой продолжительности измерений составляли 2, 10, 10 и 40 Бк/кг для цезия, радия, тория и калия, соответственно. Содержание ^{40}K, ^{232}Th, ^{226}Ra в пробах почвы, отобранных на радиоактивно загрязнённых участках Брянской области, не имеет значимых отличий от референтных участков [173].

На всей территории ПГРЭЗ присутствуют значимые уровни загрязнения долгоживущими радионуклидами ^{238,239,240,241}Pu, ^{241}Am, ^{137}Cs, ^{90}Sr (табл. 2). Основным дозообразующим радионуклидом на большинстве изучаемых территорий Брянской и Гомельской областей является ^{137}Cs.

Таблица 2 – Плотность загрязнения участков в ПГРЭЗ [6]

Участок	^{238,239,240}Pu, кБк/м^2	^{241}Pu, кБк/м^2	^{241}Am, кБк/м^2	^{137}Cs, кБк/м^2	^{90}Sr, кБк/м^2
Кож	1.0–4.0	1–10	0.4–1.0	200–400	20–40
Мас	20–40	500–1000	> 100	2000–4000	> 750
Кул	10–20	250–500	4–20	4000–7500	200–400

На участках Брянской и Гомельской областей брали по 20–50 шишек с каждого из 20–29 деревьев на высоте от 1.5 до 2 м от поверхности почвы. Содержание ^{137}Cs в шишках определяли методом γ-спектрометрии также на многоканальном анализаторе IN-1200 (Франция), ошибка измерений не превышала ±10%. Содержание ^{90}Sr оценивали радиохимическим методом, при котором озоляли отобранные пробы в фарфоровых чашках при температуре 600 °C. ^{90}Sr выделяли оксолатным методом, путём обработки золы 6 моль/л раствором соляной кислоты, доведённой до кипения. Предел количественной оценки составлял 0.05 Бк при длительности измерения 1800 с. По результатам γ-спектрометрии почвы и шишек и радиохимического анализа шишек были получены данные о содержании радионуклидов в пробах, представленные в табл. 3.

Расчет дозовых нагрузок в сосновых кронах от исследуемых радионуклидов выполнялся С.И. Спиридоновым с соавт. с использованием модели, подробно описанной в работах [116, 173]. Наибольший вклад в формирование дозы в кронах сосны в Брянской области вносит внешнее облучение от ^{137}Cs, содержащегося в верхнем 10-см слое почвы. Содержание радионуклидов в кронах невысоко, поэтому вклад от них в суммарную дозовую нагрузку ниже, чем от ^{137}Cs в почве, и он формируется главным образом за счет β-излучения [116]. В качестве исходных данных по популяциям Гомельской области принимались средние значения плотностей загрязнения территорий реперных площадок (табл. 2). Результаты расчёта поглощённой дозы, формируемой γ-, β- и α-излучением (Dγ, Dβ, Dα), а также суммарной дозы (Dsum) приведены в табл. 4. Годовые поглощённые дозы указаны с учётом вклада природного радиационного фона, включая содержание естественных радионуклидов [173].

Таблица 3 – Содержание радионуклидов в почве и шишках, 2016 г.

Участок	Слой почвы	Удельная активность ^{137}Cs в почве, Бк/кг	Удельная активность в шишках, Бк/кг	
			^{137}Cs	^{90}Sr
К	0–5 см	13.2±2.6	4.2±2	1.12±2.3
	5–10 см	16.2±2.8		
К1	0–5 см	156±19.8	12.6±3.8	0.79±1.3
	5–10 см	127±12.2		
ВИУА	0–5 см	10800±810	207±26	11.34±2.4
	5–10 см	778±65		
	10–15 см	417±33		
СБ	0–5 см	13000±1580	302±39	35.91±4.4
	5–10 см	12200±1480		
	10–15 см	653±80		
ЗП	0–5 см	35600±2992	2170±266	43.22±2.8
	5–10 см	4350±405		
	10–15 см	1120±136		
ЗК	0–5 см	46200±3243	1420±176	48.69±3.7
	5–10 см	4890±340		
	10–15 см	1460±117		
Кож	0–5 см	3142 ± 33	3200±380	6295±53
	5–10 см	865 ± 17		
	10–15 см	296 ± 9		
Кул	0–5 см	66300 ± 820	5470±666	1050±12.6
	5–10 см	12900 ± 200		
	10–15 см	2680 ± 33		
Мас	0–5 см	41700 ± 330	14000±1700	4246±40
	5–10 см	3823 ± 71		
	10–15 см	1358 ± 29		

Таблица 4 – Годовые дозы облучения кроны сосновых деревьев, мГр, 2016 г.

Участок	Dγ	Dβ	Dα	Dsum
К	0.70	0.0038	0	0.70
К1	0.90	0.0058	0	0.90
ВИУА	10.6	0.090	0	10.7
СБ	19.9	0.175	0	20.1
ЗП	33.0	0.805	0	33.8
ЗК	38.7	0.571	0	39.3
Кож	4.50	14.2	0.7	19.4
Кул	63.3	4.0	35.1	102.4
Мас	38.1	13.5	77.6	129.2

Содержание тяжёлых металлов в почвах всех площадок Брянской области не превышает ПДК, почва дерново-подзолистая супесчаная, гранулометрический состав одинаков [21]. На экспериментальных участках ПГРЭЗ почва песчаная.

Все участки характеризуются гомогенным древостоем и достаточно высоким представительством (не менее 70%) сосновых деревьев в фитоценозе. Рельеф равнинный, тип леса в зависимости от участка: сосняк мшистый или сосняк лишайниково-мшистый. Возраст исследуемых деревьев на всех пробных площадках 30–50 лет. Средняя высота сосен от 12 до 17 м, средний диаметр от 10 до 18 см.

Подрост на экспериментальных участках представлен сосной обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и березой бородавчатой (*Betula pendula* Roth.). Подлесок характеризуется наличием рябины (*Sorbus aucuparia* L.,), крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.,), редко дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). В травянисто-кустарничковом ярусе экспериментальных участков встречаются овсяница овечья (*Festuca ovina* L.), земляника лесная (*Fragaria vesca* L. (sp)), вейник наземный (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), брусника (*Vaccinium vitis-idaea* L.), вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* (L.) Hill), редко – орляк обыкновенный (*Pteridium aquilinum* (L.)), вероника лекарственная (*Veronica officinalis* L.), черника

(*Vaccinium myrtillus L.*), ландыш майский (*Convallaria majalis* L.), золотая розга (*Solidago virga-aurea* L.). Моховой покров представлен зелеными мхами с преобладанием плеврозимуа Шребера (*Pleurozium Schreberi* (Brid.) Mitt.), реже – дикранум (*Dicranum polysetum* Sw.), единично – политрихум обыкновенный (кукушкин лён обыкновенный) (*Polytrichum commune* Hoppe).

2.3 Оценка морфометрических показателей хвои

Для морфометрических исследований отбор двухлетней хвои проводили в ноябре-декабре 2011, мае 2013 и 2014 гг. на территории Брянской области, а в мае 2016 г. ещё и в Гомельской области на территории ПГРЭЗ с 14–16 деревьев на каждом участке. В 2011 г. отбирали по 20, в последующие годы – по 40 пар хвоинок с каждого дерева. Хвою без признаков усыхания отбирали на высоте 1.5–2 метра с разных сторон дерева и хранили в морозильной камере до проведения измерений. Оценивали следующие морфометрические показатели хвои: длина, масса, индекс флуктуирующей асимметрии. Парные хвоинки разделяли и проводили измерения длины и массы обеих хвоинок отдельно. Длину хвои измеряли линейкой с точностью до 0.5 мм. Далее хвою подсушивали, в 2011 г. две недели при температуре 21–23 °С, а в последующие годы – 14 мин в сухожаровом шкафу с доведением температуры до 115–125 °С. Взвешивание проводили на лабораторных аналитических весах марки Ohaus Adventurer Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, USA) с точностью до 0.1 мг.

Для определения индекса флуктуирующей асимметрии использовали методику, разработанную в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН авторским коллективом учёных под руководством д.б.н., чл.-корр. РАН В.М. Захарова и рекомендуемую Центром экологической политики России [42].

Индекс флуктуирующей асимметрии по длине (FA_L) и массе (FA_W) хвоинок рассчитывали по формулам 2 и 3, соответственно [197, 227]:

$$FA_L = 2 \times \left| \frac{L_1 - L_2}{L_1 + L_2} \right| \quad (2)$$

$$FA_w = 2 \times \left| \frac{W_1 - W_2}{W_1 + W_2} \right| \quad (3)$$

где L_1 и L_2 – длина 1-й и 2-й хвоинок, W_1 и W_2 – их масса.

Чем выше значения этого показателя, тем сильнее нарушается гомеостаз развития.

Также устанавливали класс повреждённости хвои некрозом и отмечали нарушения морфогенеза (многохвойные брахибласты). Выделяли три класса некротических повреждений хвоинок: 1 – хвоинки без некротических пятен; 2 – немного мелких пятнышек; 3 – много чёрных и жёлтых пятен, иногда во всю ширину хвоинки [146].

2.4 Определение тератоморфных форм пыльцы

Согласно исследованиям гербарного материала [32] показано, что пыльцевые зёрна сосны обыкновенной полиморфны даже в условиях относительного экологического благополучия (1883–1924 гг.). Спонтанная частота абортивных пыльцевых зёрен всех видов составляет 3–7% [18, 32, 215].

В норме пыльцевое зерно сосны обыкновенной имеет тело и два симметрично расположеных и одинаковых по размеру воздушных мешка, формирующихся при расхождении слоёв экзины, пространство между которыми у сформированного зерна заполнено воздухом.

Пыльцу сосны собирали в 2013 и 2014 гг. в 6 популяциях, а в 2016 г. в 9 популяциях в период пыления (середина мая) с 15 деревьев по 10–30 стробилов с дерева на каждом участке, затем хранили в холодильнике с $CaCl_2$, согласно методике [24, 119].

Для приготовления препарата для анализа аномалий пыльцевых зёрен использовали 2 мл аптечной йодной настойки, разбавленной слабым раствором сахарозы до 10 мл. Пыльцу выдерживали в растворе в течение двух минут, затем накрывали каплю покровным стеклом и рассматривали препарат на микроскопе SK-14 при 120-кратном увеличении. Просматривали по 750 пыльцевых зёрен с

каждого дерева, суммарное количество проанализированных пыльцевых зёрен на участке 11250 штук. На препарате определяли количество пыльцевых зёрен для каждого типа аномалий.

При проведении всех измерений и определений образцы хвои и пыльцы кодировали, оценки проводили слепым методом.

2.5 AFLP-анализ

В качестве матрицы при проведении AFLP-анализа используются рестрикционные фрагменты ДНК, лигированные со специфичными олигонуклеотидными адаптерами. Проводится избирательная амплификация со специально сконструированными праймерами, которые состоят из фиксированной части, содержащей последовательность, комплементарную адаптеру и сайту рестрикции использованной эндонуклеазы (приблизительно 15 п.н.), и короткого фрагмента на 3′-конце с произвольной последовательностью нуклеотидов (2–4 п.н.) [249]. Фиксированная часть придаёт праймеру стабильность и в результате обеспечивает высокую воспроизводимость метода, а короткая последовательность со случайным набором нуклеотидов способствует определению и контролю пропорций лигированных фрагментов, которые могут быть амплифицированы.

Этот метод позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или в участках отжига праймеров (присутствие или отсутствие продукта амплификации в спектре) и небольшими вставками и/или делециями внутри рестрикционного фрагмента (изменение размера полосы в спектре) [249]. При вставке между соседними местами рестрикции происходит утрата короткого фрагмента и возникновение более длинного. Недостатками AFLP-маркёров являются доминантность аллелей и возможная негомологичность одинаковых по длине фрагментов – гомоплазия.

Для оценки генетического полиморфизма однолетнюю хвою сосны отбирали в 2015 г. по 5 хвоинок с 15–20 деревьев в референтной популяции К1 и

на 7-ми импактных площадках на высоте 1.5–2 м с разных сторон кроны. Пробу помещали в криопробирки объёмом 2.5 мл и замораживали в жидком азоте для транспортировки и хранения.

В табл. 5 представлены основные реактивы, использованные для проведения AFLP-анализа.

Таблица 5 – Основные реактивы для проведения AFLP-анализа

Название	Артикул	Производитель	Страна
Адапторы для AFLP-анализа EcoRI⁄MseI AFLP® Adaptors, содержащие участки узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI и MseI, 100 реак.	AB-403077	Thermo Scientific	США
Альбумин бычий, фракция V (Heat Shock Isolation)	Am-O332-100.0	Amresco	США
АТФ, 25 μmol	RO441	Thermo Scientific	США
Рестриктаза EcoR I, 5000 е.а.	ER0271		
Рестриктаза Tru1I (MseI), (10 е.а./мкл), 1 500 е.а.	ER0982		
Смесь dNTP, 10 мМ	R0192		
Т4 ДНК-лигаза, 1000 е.а.	EL0011		
Taq ДНК-полимераза (нативная, без BSA), 500 е.а.	EP0282		
Праймер E01, 194 nmol		Евроген	Россия
Праймер E35, 205 nmol			
Праймер M03, 185 nmol			
Праймер M63, 173 nmol			

Выделение ДНК

Для колоночного выделения ДНК использовали набор DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). При выделении ДНК 100 мг хвои гомогенизировали в жидком азоте, используя ступку и пестик, затем добавляли 0.6 мл буфера AP1 (ID: 19101) и 4 мкл RNase A и продолжали гомогенизацию на гомогенизаторе SuperFastPrep-1, матрица A (MP-Biomedicals, USA). Смесь выдерживали на водяной бане 10 мин при 65 °C, переворачивая пробирку 2–3 раза в течение инкубирования. Добавляли 130 мкл буфера P3 (ID: 19053) к продукту лизиса, перемешивали на вортексе и инкубировали 5 мин на льду. После 5 мин центрифугирования при 14000 об/мин надосадочную жидкость переносили в пробирку объёмом 2 мл, осуществляли повторное центрифугирование и переносили объединённый супернатант на колонку QIAshredder Mini spin. Колонку центрифугировали 2 мин при 14000 об/мин, затем переносили отфильтровавшуюся через колонку жидкость в новую пробирку, не нарушая осадок. Добавляли 1.5 объёма буфера AW1 (ID: 19081) к очищенному лизату и перемешивали пипетированием. Переносили весь раствор на DNeasy Mini spin колонку и центрифугировали 1 мин при 8000 об/мин, затем удаляли жидкость из собирающей пробирки. Помещали DNeasy Mini spin колонку в новую 2 мл собирающую пробирку, добавляли 500 мкл буфера AW2 (ID: 19072) и центрифугировали 1 мин при 8000 об/мин. Жидкость из собирающей пробирки удалялась, и затем на колонку вновь вносили 500 мкл буфера AW2, центрифугировали 2 мин при 14000 об/мин, просушивая мембрану. Переносили DNeasy Mini spin колонки в новые пробирки и дважды добавляли 100 мкл буфера AE (ID: 19077) прямо на мембрану DNeasy, выдерживая 5 мин при комнатной температуре и центрифугируя элюат 1 мин при 8000 об/мин. Полученная очищенная ДНК хранилась в 1.5 мл пробирках при -20 °C.

Концентрацию и степень очистки ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), оценивая соотношение A260/A280 и A260/A230, где A260, A280 и A230 – оптическая плотность раствора при длине волны 260 (максимум поглощения нуклеиновых кислот), 280 (максимум

поглощения белков) и 230 (максимум поглощения углеводных, фосфатных и фенольных соединений) нм, соответственно. Концентрации ДНК P. sylvestris, использованные для амплификации, для ПЦР-анализа, превышали 400 нг/мкл. Для последующего анализа использовались только образцы с отношеним A260/A280 > 1,7 и A260/A230 > 2.

Исследование генетического полиморфизма амплифицированных фрагментов проводили по методике P. Vos с соавт. [249] с модификациями.

Приготовление первичной матрицы ДНК: рестрикция и лигирование

Рестрикция геномной ДНК

Для рестрикции 250 нг нативной ДНК использовали редко- (EcoRI) и часто-режущие (MseI) эндонуклеазы рестрикции. RL-буфер, в котором работают оба фермента, содержит 10 мМ Tris-HAc с pH 7.5, 10 мМ MgAc, 50 мМ KAc, 5 мМ DTT (дитиотреитол), 50 нг/мкл БСА (бычий сывороточный альбумин).

В табл. 6 приведены условия реакции для одного образца.

Таблица 6 – Протокол рестрикции геномной ДНК

Компонент реакции	Объём	Примечание
250 нг ДНК		Выделенная ДНК, 250 нг в 31 мкл раствора
5 ед. EcoRI	0.5 мкл	EcoRI (10 ед/мкл)
5 ед. MseI	0.5 мкл	MseI (10 ед/мкл)
RL буфер	8.0 мкл	5x RL-буфер
H_2O	до 40 мкл	MilliQ
Общий объём	40 мкл	

Перемешивали на вортексе ELMI V-3 (Латвия) 1–2 с. Встряхивали на микроцентрифуге MiniSpin plus в течение 10 с (не более 1.400g). Инкубировали минимум в течение часа при 37 °C.

Лигирование адаптеров

Перед использованием адаптеров необходимо провести их отжиг. Для этого пробирки с адаптерами прогревали в течение 5 мин на водяной бане при 95 °С, остужали до комнатной температуры не менее 10 мин, затем прокручивали в микроцентрифуге в течение 10 секунд при 1.400g.

Добавляли к ДНК после рестрикции 10 мкл следующей смеси (табл. 7) в расчёте на 1 образец.

Таблица 7 – Протокол лигирования адаптеров

Компонент реакции	Объём	Примечание
EcoRI адаптер	1.0 мкл	EcoRI адаптер (5 пМ/мкл)
MseI адаптер	1.0 мкл	MseI адаптер (50 пМ/мкл)
Макроэрг	1.0 мкл	10 мМ АТФ
Буфер	2.0 мкл	5x RL-буфер
Фермент	0.2 мкл	1 ед. Т4 ДНК-лигазы (5 ед/мкл)
H_2O	4.8 мкл	MilliQ
Общий объём	10.0 мкл	

Перемешивали на вортексе 1–2 с. Встряхивали на микроцентрифуге в течение 10 с (не более 1.400g). Инкубировали 3 часа при 37°С. Разбавляли первичную ДНК-матрицу десятикратно, добавив 450 мкл MilliQ воды.

Преамплификация

Для реакции преамплификации использовали пары праймеров E01 (5’ - GAC TGC GTA CCA ATT CA – 3’) и M03 (5’ – GAT GAG TCC TGA GTA AG – 3’) (номенклатура Keygene) [201]. ПЦР проводили на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Москва).

Для приготовления 5 мМ раствора dNTP использовали по 50 мкл 100 мМ dATP, dCTP, dGTP, dTTP и 800 мкл особо чистой воды до общего объёма 1000 мкл. Для 10х ПЦР-буфера использовали 20 мл 0.5М Tris-HCl pH 8.3, 10 мл 150

мМ $MgCl_2$, 50 мл 1М KCl и 20 мл особо чистой воды (MilliQ). Готовые реакционные смеси разделяли на аликвоты и замораживали.

Состав для приготовления реакционных смесей для преамплификации показан в табл. 8.

Таблица 8 – Протокол преамплификации

Смесь праймеров/dNTP для одного образца:	
Компонент реакции	Объём
30 нг праймера E01, 50 нг/мкл	0.6 мкл
30 нг праймера M03, 50 нг/мкл	0.6 мкл
5 мМ dNTPs	0.8 мкл
H_2O (MilliQ)	3 мкл
Общий объём:	5 мкл
Перемешивали на вортексе 1–2 с. *Смесь Taq-полимеразы для 1 образца:*	
10х ПЦР-буфер	2 мкл
Taq-ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0.08 мкл
H_2O (MilliQ)	7.92 мкл
Общий объём:	10.00 мкл
Перемешивали на вортексе 1–2 с. *Итоговая смесь для ПЦР:*	
Первичная ДНК-матрица	5 мкл
Смесь праймеров/dNTP	5 мкл
Смесь Taq-полимеразы	10 мкл
Общий объём:	20 мкл

Перемешивали на вортексе 1–2 с. Профиль преамплификации: 10 мин при 94 °С и 24 цикла (30 с – денатурация при 94 °С, 30 с – отжиг при 56 °С, 60 с – элонгация при 72 °С).

Амплификация с селективными праймерами

Использовали пары праймеров: меченный флуоресцентным красителем FAM E35 (5’ - GAC TGC GTA CCA ATT CAC A – 3’) и M63-C (5’ – GAT GAG TCC TGA GTA AGA AC – 3’) для второй амплификации (номенклатура Keygene) [201].

Состав для приготовления реакционных смесей приведён в табл. 9.

Таблица 9 – Протокол амплификации

Смесь праймеров/dNTP для одного образца:	
Компонент реакции	Объём
30 нг праймера E35	0.6 мкл
30 нг праймера M63-C	0.6 мкл
5 мМ dNTPs	0.8 мкл
H_2O (MilliQ)	3.0 мкл
Общий объём:	5.0 мкл
Перемешивали на вортексе 1–2 с. *Смесь Taq-полимеразы для 1 образца:*	
10х ПЦР-буфер	2 мкл
Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0.08 мкл
H_2O (MilliQ)	7.92 мкл
Общий объём:	10.00 мкл
Перемешивали на вортексе 1–2 с. *Итоговая смесь для ПЦР:*	
ДНК-матрица	5 мкл
Смесь праймеров/dNTP	5 мкл
Смесь Taq-полимеразы	10 мкл
Общий объём:	20 мкл

Перемешивали на вортексе 1–2 с.

Профиль ступенчатой ПЦР: 5 мин при 94 ºС, 10 циклов (30 с – денатурация при 94 °С, 30 с – отжиг при 65–56 °С со снижением на 1 °С каждый цикл, 60 с – элонгация при 72 °С) и 20 циклов с отжигом при 56 °С и элонгацией при 72 °С в течение 30 мин. Отрицательный контроль был включён для каждой проводимой реакции. Часть образцов ДНК анализировали в агарозном геле и окрашивали красителем SYBR Green для визуализации.

2.5 Анализ данных

Анализ ПЦР-продуктов методом капиллярного электрофореза был проведён по договору с центром коллективного пользования ФГБНУ ВНИИСХБ в г. Москва. Использовали ABI Prism Genetic Analyzer 3130xl с внутренним стандартом Evrogen S450 (флуоресцентный краситель LIZ).

В качестве мутаций рассматривали наличие или отсутствие конкретного фрагмента (аллеля). Наличие фрагмента у единственного дерева в популяции рассматривалось как изменение электрофоретической подвижности, а отсутствие фрагмента в единственном образце в популяции – как нуль-мутация.

Анализ хроматограмм проводили с использованием программного обеспечения Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Идентификация пиков и проверка их качества были выполнены в среде R CRAN в RawGeno v2.0-2 [151]. AFLP-профили анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Процент полиморфных локусов и генетические расстояния между популяциями были оценены с использованием AFLPsurv v1.0 [246]. На основе матрицы генетических расстояний между популяциями, рассчитанной по формуле M. Nei [222] методом невзвешенных арифметических средних, была создана дендрограмма в POPGENE v1.32. Частоту мутаций рассчитывали как число мутаций на локус на особь. Значимость отличий от референтной популяции частоты мутаций и процента полиморфных локусов была проверена с помощью критерия хи-квадрат в Statistica 8.0. С помощью байесовского подхода [258] вычисляли частоту нуль-аллелей, используя пакет прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007. Среднее генетическое разнообразие на

локус по Неи для выборок небольшого размера [156] было также рассчитано в Microsoft Office Excel 2007, а различия между популяциями были оценены в Statistica 8.0.

Данные были проверены на наличие выбросов по критериям Диксона [86] и Граббса [145]. В случае отклонения нулевой статистической гипотезы на уровне значимости $\alpha = 0.05$, экстремальное значение признавали выбросом и исключали из дальнейшего анализа. В каждом варианте объёмы выборок (количество хвоинок, пыльцы и деревьев) достаточны для получения оценок изучаемых параметров с фиксированной относительной погрешностью 20–30% при 95%-ной доверительной вероятности [19].

Была проведена проверка на нормальность распределения с помощью *W*-теста Шапиро-Уилка в Statistica 8.0. Для определения значимости различий между средними значениями длины хвои использовали *t*-тест Стьюдента [86], для всех остальных показателей использовали критерий Манна-Уитни (*U*-тест) в Statistica 8.0. Проведён корреляционный анализ зависимости исследуемых параметров от дозовой нагрузки. Статистические гипотезы отклоняли при уровне значимости $p<0.05$. При интерпретации результатов корреляционного анализа считали, что наблюдается зависимость между показателями на уровне тенденции, если расчетный уровень значимости *p* принимает значение от 0.05 до 0.10. В таблицах, рисунках и тексте представлены средние значения и стандартные ошибки среднего.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка состояния хвои сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия

Для оценки состояния хвои в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях Брянской и Гомельской областей, использовали следующие параметры хвои: длина, масса, индекс флуктуирующей асимметрии, класс и частота повреждённости некрозом, морфозы.

3.1.1 Определение длины и массы хвои сосны, произрастающей на радиоактивно загрязнённых территориях

Результаты измерения длины и массы парных хвоинок сосны обыкновенной, произрастающей на контрольных и радиоактивно загрязнённых участках Брянской и Гомельской областей, представлены на рис. 3 и 4. Анализ полученных результатов выявил значимое разнонаправленное отличие длины хвои на участках ВИУА и СБ от контрольного уровня [208]. Видимо, в связи с низкой радиационной нагрузкой на растения данных участков, преобладает влияние иных факторов, среди которых важное место занимают метеорологические условия. На исследуемых популяциях показано, что повышенные температуры и количество осадков влияют на всхожесть и количество абортивных семян [176]. В работе [183] длина хвои имела значимую положительную корреляцию со средней температурой текущего вегетационного периода, особенно с температурой июня-августа. На участках Кожушки и Масаны с наибольшим вкладом β-излучения в годовую дозу присутствует значимое ($p<0.05$ и $p<0.01$) снижение длины хвои (рис. 3).

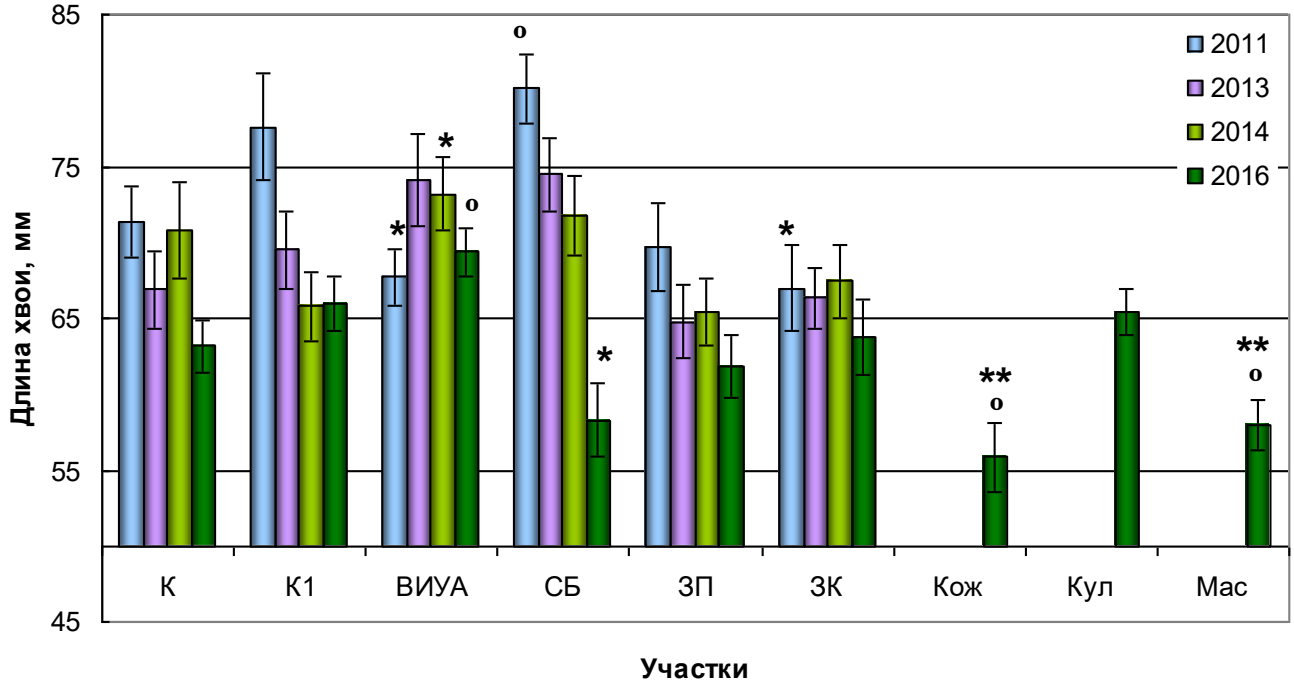

Рисунок 3 – Длина хвои сосны обыкновенной в изучаемых популяциях

^{o} – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$, t-тест;

* и **– значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$ и $p<0.01$, t-тест

Для того, чтобы оценить зависимость морфометрических показателей хвои от радиационной нагрузки на изучаемых территориях, был проведен корреляционный анализ между длиной/массой хвои, расчётными значениями годовой поглощённой дозы в кронах деревьев, МЭД, удельными активностями ^{137}Cs в почве на глубине 0–5 см, 5–10 см, 10–15 см, удельными активностями ^{137}Cs и ^{90}Sr в шишках. Данные о годовой дозе были получены в 2016 г. расчётным путём, а о МЭД – в результате прямых измерений в каждый год исследования. В результате анализа в 2016 г. выявлена статистически значимая корреляция длины хвои сосны с поглощённой дозой от β-излучения (r=-0.68, p=0.043) и удельной активностью ^{90}Sr в шишках (r=-0.70, p=0.036).

В отличие от длины хвои, где значимость различий между средними значениями определяли с помощью t-теста Стьюдента (рис. 3), для массы хвои и остальных показателей, в связи с их отличием от нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни.

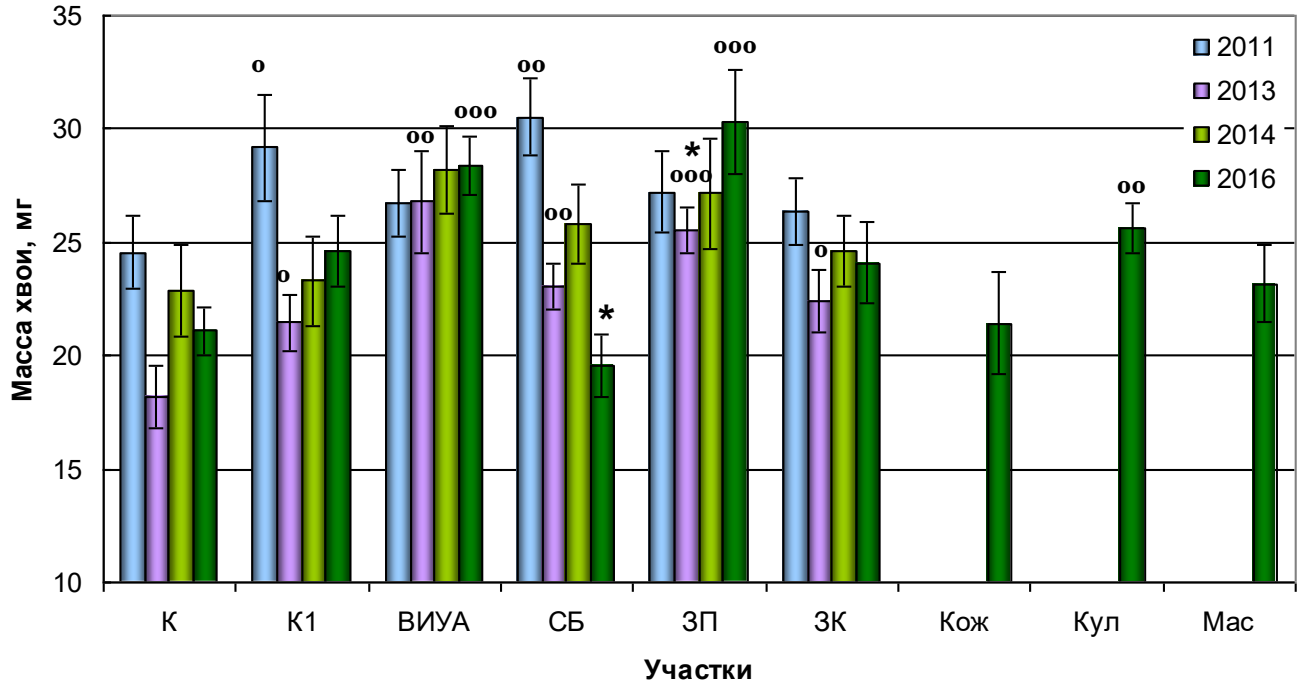

Рисунок 4 – Масса хвои сосны обыкновенной в изучаемых популяциях

^{o}, ^{oo} и ^{ooo} – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, *U*-тест;

* – значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$, *U*-тест

Масса хвои сосны в 2013 г. значимо увеличена на всех участках относительно одной контрольной популяции – К [207]. В 2011 г. данный показатель на другом контрольном участке К1 и участке СБ превышает уровень контрольного участка К. Значимое превышение массы хвои ($p<0.001$) наблюдается в популяциях ВИУА и ЗП, а также Кул ($p<0.01$) в 2016 г. относительно той же референтной популяции К [209]. Зависимость массы хвоинок от параметров, характеризующих радиационную обстановку на изученной территории, не выявлена. При этом масса хвоинок 2013 и 2014 гг. значимо коррелирует между собой ($r=0.95$; $p=0.003$), также имеется корреляция массы хвоинок в 2013 и 2016 гг. ($r=0.73$; $p=0.098$). Анализ изменчивости длины и массы хвои показал отсутствие зависимости дисперсии от уровня дозовой нагрузки.

Таким образом, на импактных участках хвоя сосны является, в основном, не только более короткой, чем в референтных популяциях, но и более тяжёлой. Возможно, это адаптивная реакция неспецифического характера на ухудшение

условий окружающей среды. Данное явление встречалось в других работах [121, 238] как при действии острого, так и хронического облучения. Угнетение ростовых процессов, характеризующееся снижением длины хвои, линейного прироста побегов, массы хвои и др. наблюдалось и при высоких уровнях промышленных выбросов [8] и радионуклидного загрязнения [130]. При этом Г.М. Козубовым с соавт. [66] было обнаружено стимулирующее действие облучения в дозах 0.7–1 Гр на сосну, увеличивавшее массу хвои в 1.5 раза.

Гигантизм хвои является, вероятно, следствием нарушения морфогенетических и метаболических процессов в целом облучённом растении. По данным Н.И. Гольцовой [25], полная или частичная гибель терминальных и латеральных почек привела к увеличению продолжительности жизни старой, доаварийной хвои 1984–1985 гг. По-видимому, с гибелью апикальных почек уменьшилось или полностью исчезло апикальное доминирование, регулируемое ауксинами и цитокининами, вследствие чего цитокинины, транспортируемые вверх из корня в условиях гибели верхушечных почек, стимулировали рост оставшихся адвентивных и спящих почек [88]. После аварии на АЭС Фукусима показано, что и у молодых деревьев японской красной сосны и японской ели облучение вызвало снятие апикального доминирования при дозе 0.13–40 мкГр/ч [252, 257].

Согласно работам Н.И. Гольцовой [25], Г.М. Козубова и А.И. Таскаева [70], увеличение размеров хвои связано с тем, что в гигантской хвое сосны увеличивается диаметр смоляных каналов, в 1.5–2 раза возрастает площадь поперечного сечения эпидермы и гиподермы, а также площадь сечения проводящего цилиндра. В целом, увеличение сечения отдельных элементов шло параллельно с увеличением общей площади сечения хвои. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении хвои ели. В 1987 г. у подавляющего большинства деревьев резко возросли все параметры хвои и на вегетативных побегах сформировалась крупная прямая и сильно изогнутая утолщённая хвоя. В 1987 г. наряду с общим увеличением параметров хвои ели наблюдали возрастание диаметров клеток эпидермы, гиподермы и мезофилла, причём наиболее

интенсивное укрупнение гистологических элементов было отмечено у хвои с максимальными площадями сечения (которые превысили показатели даже доаварийного 1985 г.), т.е. абсолютные показатели, как правило, были пропорциональны общим морфометрическим показателям. Относительные (парциальные) объёмы тканей оставались близкими к нормальной хвое. Некоторым исключением являлся относительный объём проводящего цилиндра, который достиг наибольших величин у сильно укороченной хвои в 1986 г. и у гигантской хвои в 1987 г. Значительно увеличились также диаметры смоляных каналов [25, 70].

Можно предположить, что выявленный в представленной работе эффект увеличения массы хвои относительно только одной референтной популяции является проявлением стимулирующего действия малых доз радиации или, что также вероятно, обусловлен индивидуальной изменчивостью популяции или локальными условиями произрастания.

Формирование утолщённой и укороченной хвои может быть обусловлено уменьшением синтеза ауксинов. Ауксины – единственная группа фитогормонов, контролирующая направленные ростовые движения растений, а также асимметричность деления клеток в эмбриогенезе. К основным функциям ауксинов относятся: контроль клеточного цикла, стимуляция роста клеток растяжением, контроль полярности развития растительного организма, фото- и гравитропические реакции, стимуляция закладки боковых и придаточных корней, стимуляция закладки и развития латеральных органов в апикальной меристеме побега [79]. В первый период после острого облучения угнетение активности меристем приводит к резкому снижению синтеза ауксинов и, как следствие, временным сдвигам ростовых процессов, нарушению нормальной ориентации побегов, аномальной ритмике роста, карликовости и гигантизму вегетативных органов [69]. Возможно, хроническое облучение также оказывает модифицирующее действие на синтез ауксинов, однако эта гипотеза нуждается в дополнительном изучении.

3.1.2 Оценка индекса флуктуирующей асимметрии по морфометрическим показателям хвои

Данные о длине и массе парных хвоинок были использованы для оценки индексов флуктуирующей асимметрии по длине и массе хвои и изучения закономерностей их изменения в условиях хронического радиационного воздействия.

Результаты исследования индекса флуктуирующей асимметрии по длине хвои сосны обыкновенной, произрастающей на радиоактивно загрязнённой территории, представлены на рис. 5. На площадках Брянской области с максимальными уровнями радиоактивного загрязнения индекс FA_L значимо превышает контрольный уровень (p<0.05; p<0.01) в 2011, 2013 и 2016 гг. Только в 2014 г. на участках ВИУА и СБ имеет место более низкий, чем в контроле индекс флуктуирующей асимметрии. Также на площадке с максимальным вкладом β-излучения (Кож) наблюдается повышенное значение FA_L по сравнению с референтной популяцией [209].

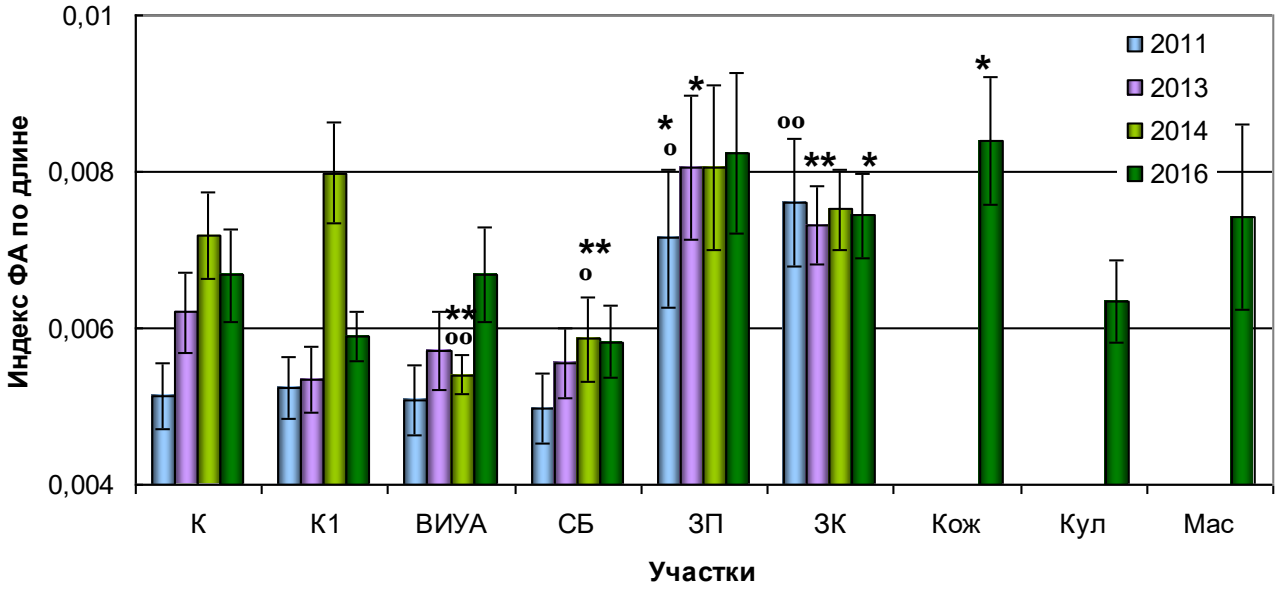

Рисунок 5 – Индекс флуктуирующей асимметрии длины хвои в изучаемых популяциях

^{o} и ^{oo} – значимые отличия от контроля К, p<0.05 и p<0.01, U-тест;

* и ** – значимые отличия от контроля К1, p<0.05 и p<0.01, U-тест

Индекс флуктуирующей асимметрии по длине хвои в 2011 и 2013 гг. статистически значимо возрастает вместе со многими показателями уровня радиоактивного загрязнения (табл. 10). В 2014 и 2016 гг. такая зависимость практически отсутствует.

Таблица 10 – Значения коэффициентов корреляции между индексом флуктуирующей асимметрии длины хвои и показателями радиационной нагрузки

Год отбора	^{90}Sr в шишках	^{137}Cs в шишках	^{137}Cs в почве, 0-5 см	МЭД I	МЭД II	Dγ	Dβ	Dsum
2011	0.77	0.91*	0.94**	0.91*	0.81	0.87*	0.91*	0.87*
2013	0.70	0.95**	0.83*	0.92*	0.92**	0.78	0.93**	0.79
2014	0.10	0.47	0.28	0.37	0.38	0.18	0.43	0.18
2016	0.57	0.29	0.14	0.88*	0.10	0.08	0.54	0.14

Значимость корреляции: * p<0.05; ** p<0.01. I – год, предшествующий отбору; II – год отбора.

Помимо этого можно добавить, что присутствует значимая корреляция индекса ФА по длине хвоинок между годами исследования: для 2011 и 2013 гг. (r=0.90; p=0.013), для 2011 и 2016 гг. (r=0.83; p=0.039), для 2013 и 2016 гг. (r=0.96; p=0.002).

Анализ изменчивости индекса флуктуирующей асимметрии по длине выявил значимый рост дисперсии при увеличении показателей радиоактивного загрязнения в 2011 г. (табл. 11). В 2013 и 2016 гг. эта закономерность статистически подтверждается только для удельной активности ^{137}Cs в шишках, а также для мощности экспозиционной дозы, измеренной в год, предшествующий отбору.

Таблица 11 – Значения коэффициентов корреляции между уровнем дисперсии FA_L и показателями радиационной нагрузки

Год отбора	^{90}Sr в шишках	^{137}Cs в шишках	^{137}Cs в почве, 0–5 см	МЭД I	МЭД II	Dγ	Dβ	Dsum
2011	0.80	0.99***	0.92**	0.98***	0.94**	0.88*	0.98***	0.88*
2013	0.46	0.83*	0.50	0.85*	0.81	0.50	0.80	0.51
2014	0.41	0.76	0.40	0.72	0.74	0.42	0.73	0.43
2016	0.53	0.77*	0.28	0.87**	0.43	0.25	0.63	0.58

Значимость корреляции: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. I – год, предшествующий отбору; II – год отбора.

Закономерности изменения индекса флуктуирующей асимметрии, оценённого по массе парных хвоинок (FA_W), оказались отличными от закономерностей, выявленных для индекса ФА по длине хвои (рис. 6). FA_W не отличается от контрольного уровня во всех импактных популяциях во все годы, за исключением участков СБ и ЗП в 2014 г.

Зависимости индекса ФА по массе хвои от годовой дозы, мощности экспозиционной дозы, удельных активностей ^{137}Cs в почве, ^{137}Cs и ^{90}Sr в шишках не обнаружено. Исключением является значимая корреляция между FA_W 2013 г. и удельной активностью ^{137}Cs в слое почвы 5–10 см (r=0.86; p=0.026) [208].

Полученные в настоящей работе значения FA_W выше, чем FA_L и соответствуют литературным данным для сосны [197]. Возможно, отсутствие корреляции данного показателя с уровнем радиационного воздействия связано с высокой дисперсией FA_W, превышающей в среднем в 25 раз аналогичный параметр для индекса ФА по длине хвои.

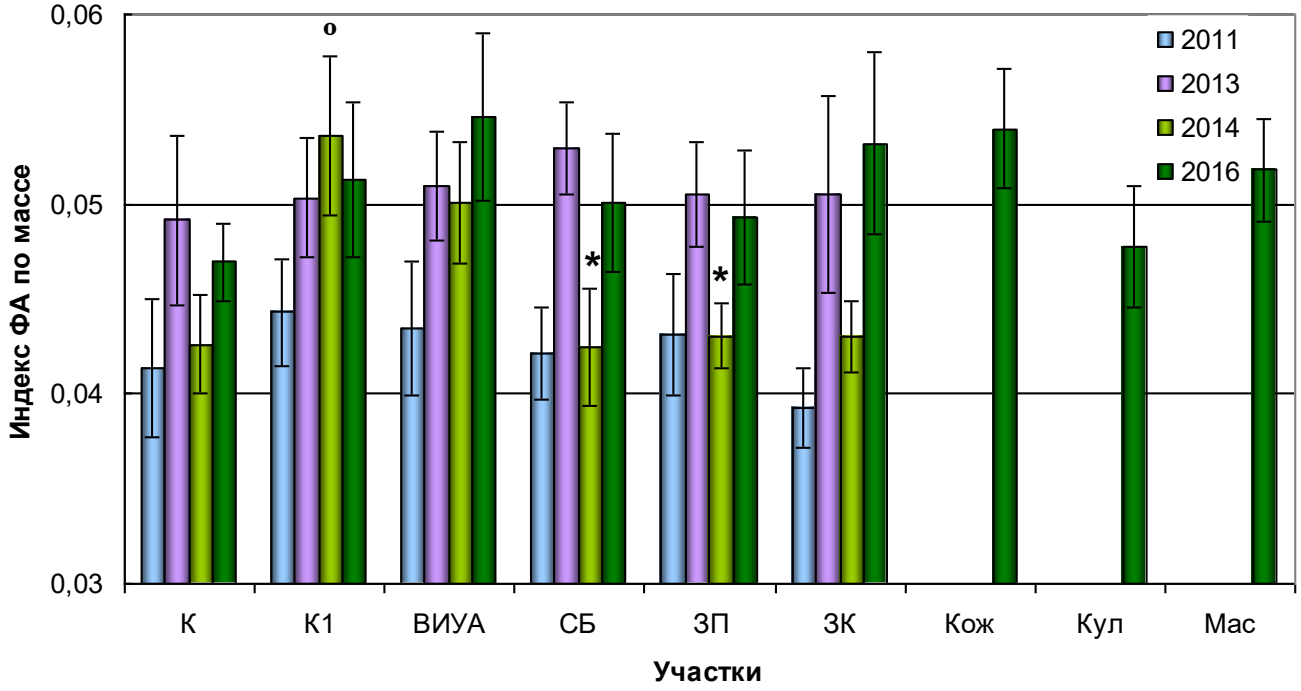

Рисунок 6 – Индекс флуктуирующей асимметрии массы хвои в изучаемых популяциях

^{o} – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$, U-тест;

* – значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$, U-тест

Для разных видов растений было показано, что ФА зависит, помимо влияния техногенного воздействия, от многих других характеристик окружающей среды. Но естественные отклонения в параметрах среды (присутствие различий в почвенных характеристиках, гидрологическом, температурном и других режимах на пробных участках, некоторая разница в видовом составе и структуре изученных сообществ, в освещённости целых растений или отдельных их частей и т.д.), к которым растения адаптированы в течение миллионов лет эволюции, должны оказывать меньшее влияние на асимметрию, чем относительно «новый» экологический фактор – присутствие в среде повышенного количества радионуклидов (к воздействию которых, однако, растения данных территорий могут адаптироваться).

Метод оценки флуктуирующей асимметрии на сосне обыкновенной для определения воздействия техногенного загрязнения был впервые применён относительно недавно – в 1999 г. [12, 195]. Были установлены нарушения в росте

и развитии популяций сосны по мере приближения к Ковдорскому горно-обогатительному комбинату и комбинату Североникель (основными поллютантами являются никель, медь и их производные, и сульфаты), что выражалось в уменьшении длины хвои и увеличении асимметрии в её длине. Аналогичный эффект наблюдался и в работе [196] близ медно-никелевого завода в Финляндии.

Действие промышленных комбинатов на морфометрические показатели хвои сосны обыкновенной изучалось различными учёными, например, M.V. Kozlov и P. Niemela [195], Н.В. Василевской и Ю.М. Тумаровой [12], но действие как острого, так и хронического облучения на ФА хвои сосны до сих пор остаётся малоизученным.

В основе популяционной изменчивости по флуктуирующей асимметрии лежат генетическая и средовая компоненты. По своей природе асимметрия многомерна. Эта многомерность обусловлена неустойчивостью генома на отдельных стадиях онтогенеза; гетерогенностью генотипов, образующих популяции; разным давлением отбора на каждой из стадий онтогенеза [34]. Асимметрия в условиях стресса любой природы возникает на стадии формирования тканей [41, 202]. По-видимому, асимметрия листовых органов является результатом изменения дифференциации клеток меристем на ранних этапах онтогенеза листа.

Данная морфофизиологическая вариация в строении билатеральных структур отражает неустойчивость процессов фенотипической реализации генотипа. Значительная доля общей фенотипической изменчивости (до 50% и более) в природных популяциях может объясняться онтогенетическим шумом [41]. Таким образом, флуктуирующая асимметрия служит выражением особой формы изменчивости – внутрииндивидуального разнообразия (индивидуальная изменчивость) как проявления случайной изменчивости развития. При этом известно, что хроническое радиационное воздействие может менять величину либо структуру внутрипопуляционной изменчивости [139].

Влияние радиационного воздействия на асимметрию обнаружено на разных видах растений. Значительная корреляция между флуктуирующей асимметрией листьев и плотностью загрязнения ^{137}Cs наблюдалась для трех видов растений: *Robinia pseudoacacia, Sorbus aucuparia* и *Matricaria perforate* [218]. Рядом с Чернобыльской зоной отчуждения все три вида продемонстрировали уровень нестабильности развития в три-четыре раза выше, чем в незагрязнённых районах вдали от Чернобыльской территории. Статистически значимое увеличение индекса флуктуирующей асимметрии у растений клевера обнаружено на участке промплощадки пункта временного хранения РАО Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами, где мощность экспозиционной дозы в 50–60 раз превышает естественный радиационный фон [27]. Положительная корреляции ФА листовых пластинок листьев *Maianthemum bifolium* и *Convallaria majalis* с удельной активностью ^{137}Cs в почве обнаружена на территории Государственного природного заповедника «Калужские засеки» [26]. Исследования, проведённые на урано-радиевом участке (Республика Коми), показали, что деревья берёзы повислой, для которых был отмечен наивысший показатель величины ФА морфологических структур листа, произрастали именно в местах расположения так называемых «красных» и «чёрных отвалов» – участков захоронения отходов радиевого производства [143]. Хроническое воздействие ионизирующего излучения (при мощности поглощённой дозы на поверхности почвы 4.74 мкГр/ч) приводило к увеличению интегрального индекса ФА листьев берёзы повислой (на 30%) и содержания в них хлорофилла *a* (на 50%) и хлорофилла *b* (на 83%) [47].

Как было замечено [89], обычно большая половина листа характеризуется большим содержанием хлорофилла, аскорбиновой кислоты или большей активностью каталазы и пероксидазы. Таким образом, морфологическое выражение диссимметричности имеет подтверждение в физиолого-биохимических процессах.

На сосне обыкновенной согласно работе [108] было выявлено увеличение индекса флуктуирующей асимметрии хвои при возрастании содержания в них

дозообразующего радионуклида (^{137}Cs). Однако согласно другим исследованиям [186] не было обнаружено зависимости ФА хвои сосны обыкновенной и листьев берёзы (*Betula pendula*) от уровня радиационного воздействия в ближней зоне Чернобыльской АЭС при мощности дозы от 0.1 до 40 мкГр/ч.

В настоящей работе индекс ФА, определяемый по разнице длин парных хвоинок, проявил себя как чувствительный индикатор хронического радиационного воздействия на протяжении трёх лет исследования: обнаружена статистически значимая зависимость этого показателя от ряда радиоэкологических характеристик, а также статистически значимое превышение контрольных уровней на наиболее радиоактивно загрязнённых участках Брянской области. Для ФА, определяемой по разнице массы парных хвоинок, аналогичных закономерностей не обнаружено.

3.1.3 Поражение хвои некрозом в условиях хронического радиационного воздействия

При изучении частоты встречаемости некротических зон на хвое было выделено 3 класса повреждений. Частота хвоинок 1-го класса (абсолютно здоровые) представлена на рис. 7, 2-го (несколько маленьких пятен) – на рис. 8, 3-го (много некрозных пятен) – на рис. 9. В связи с пожаром на участке К данные 2014 и 2016 гг. не могут быть использованы в качестве контрольных, поэтому исключены из нижеприведённых рисунков. По результатам данной работы можно наблюдать присутствие значительно повышенного количества здоровой хвои на наименее радиоактивно загрязнённых участках ВИУА и СБ [208] на протяжении 3-х лет исследования (2013, 2014, 2016) и участке Кож в 2016 г. (рис. 7). Устойчиво значимо самая низкая частота здоровой хвои обнаруживается на наиболее радиоактивно загрязнённом участке Брянской области ЗК.

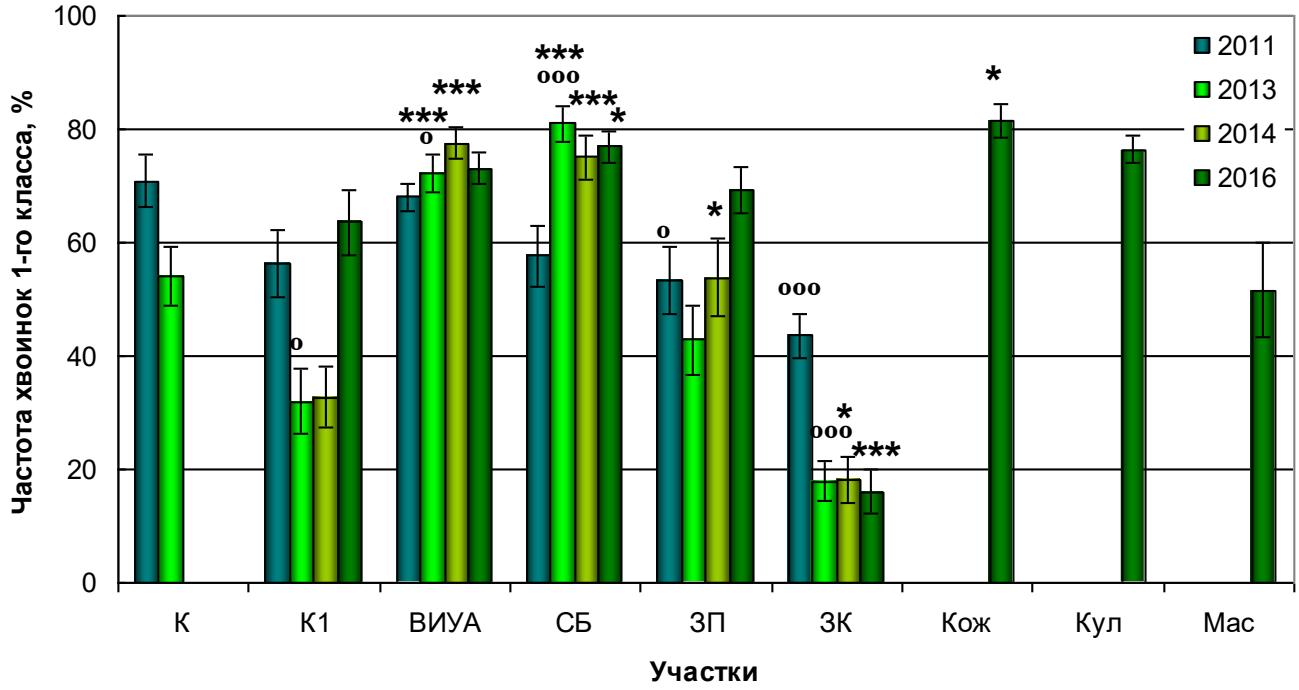

Рисунок 7 – Частота хвоинок 1-го класса поражения некрозом (абсолютно здоровые) в изучаемых популяциях

° и °°° – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$ и $p<0.001$, *U*-тест;

* и *** – значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$ и $p<0.001$, *U*-тест

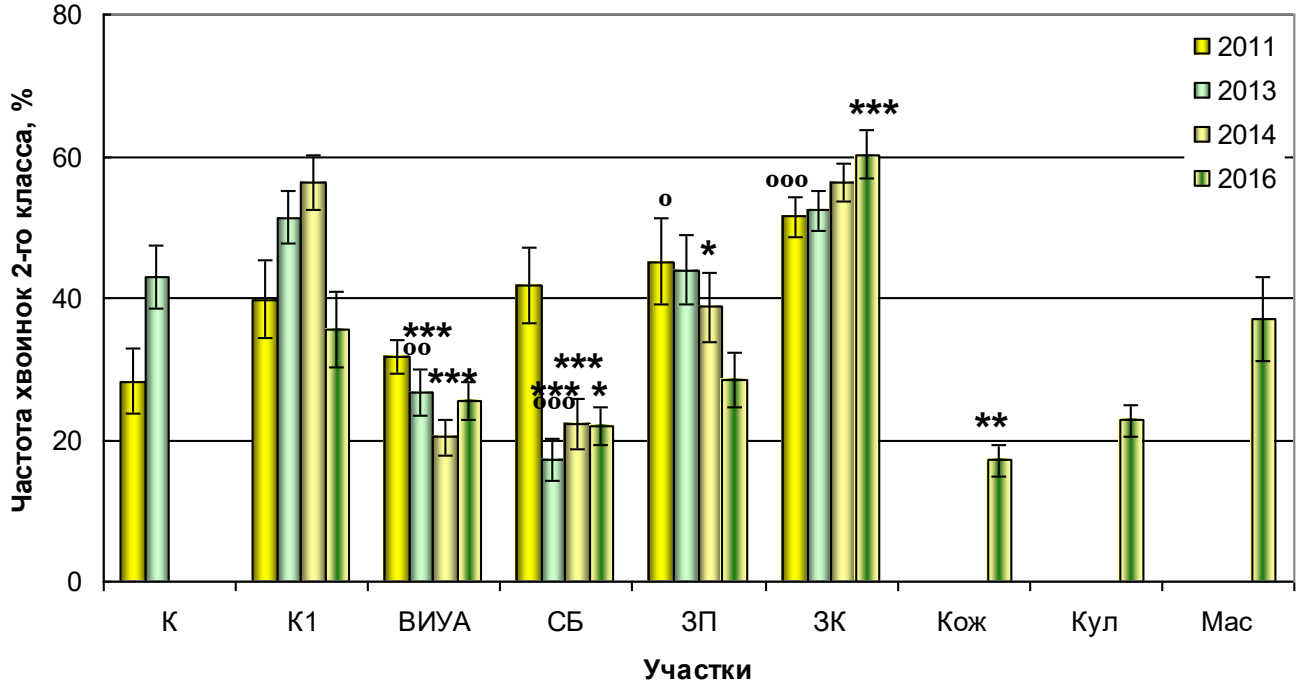

Рисунок 8 – Частота хвоинок 2-го класса поражения некрозом в изучаемых популяциях

°, °° и °°° – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, *U*-тест;

*, ** и *** – значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, *U*-тест

Противоположную картину можно наблюдать на рис. 8 и 9, где отображена низкая частота повреждения некрозом хвои на участках с наименьшим уровнем радиационного воздействия: ВИУА, СБ, Кож. На участке ЗК превышение контрольного уровня происходит в достаточно равной степени за счёт частично и сильно повреждённой некрозом хвои.

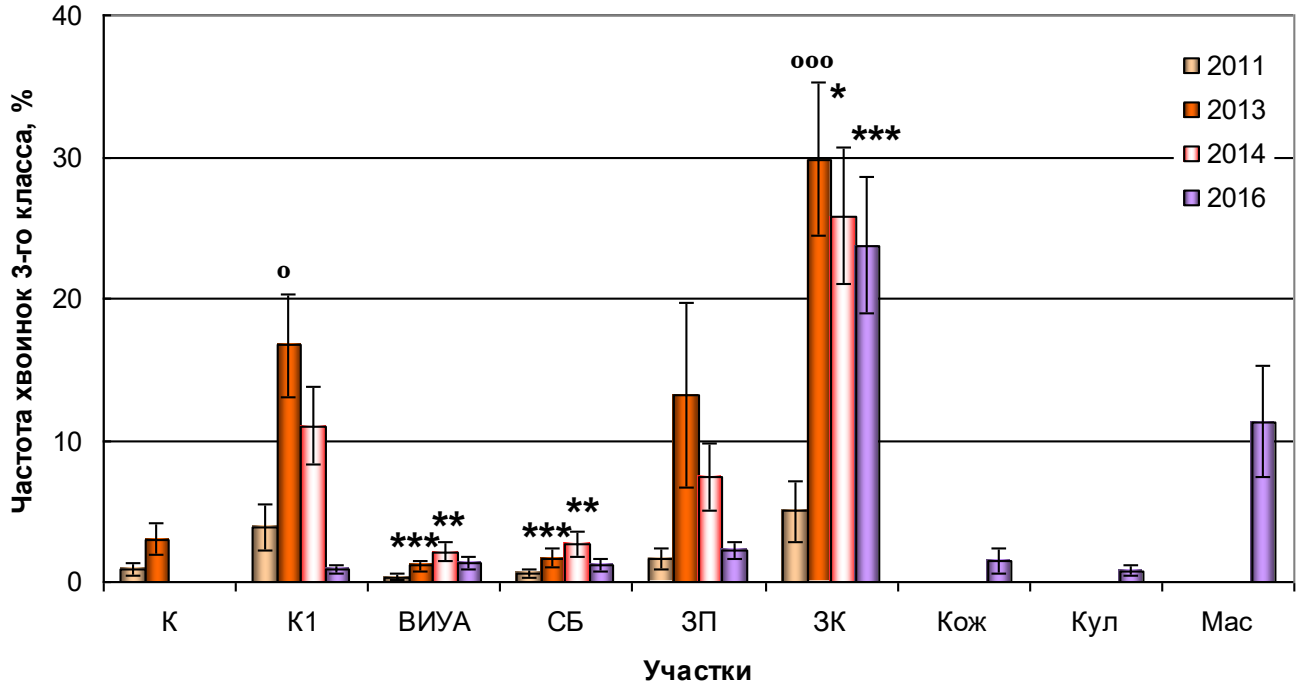

Рисунок 9 – Частота хвоинок 3-го класса поражения некрозом в изучаемых популяциях

^{o} и ^{ooo} – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$ и $p<0.001$, U-тест;

*, ** и *** – значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, U-тест

Корреляционный анализ выявил, что частота встречаемости хвои 1-го класса в 2011 г. снижается при возрастании суммарной годовой дозы (r=-0.79; p=0.061) и Dγ (r=-0.79; p=0.061), удельных активностей ^{90}Sr в шишках (r=-0.77, p=0.073) и ^{137}Cs в почве на глубине 0–5 см (r=-0.80, p=0.056) и 10–15 см (r=-0.97, p=0.032). Частота встречаемости хвои 2-го класса в 2011 г. увеличивается при росте Dsum (r=0.84; p=0.034) и Dγ (r=0.84; p=0.034), Dβ (r=0.75; p=0.087), удельных активностей ^{90}Sr в шишках (r=0.84, p=0.036) и ^{137}Cs в почве на глубине

0–5 см (r=0.83, p=0.042), МЭД 2010 г. (r=0.75, p=0.083). Обнаружена корреляция с удельной активностью ^{137}Cs в почве на глубине 10–15 см для хвои 1-го класса 2014 г. (r=-0.95, p=0.032), 2-го класса в 2014 г. (r=0.98, p=0.021), 3-го класса в 2013 г. (r=0.96, p=0.042).

По каждому классу повреждённости хвои некрозом в табл. 12 представлены коэффициенты корреляции между всеми годами исследования. Приведённые значения отображают достаточно высокую воспроизводимость результатов оценки частоты встречаемости хвои 3-го класса, позволяя рекомендовать этот показатель для биоиндикационных работ.

Таблица 12 – Значения коэффициентов корреляции частоты встречаемости некрозов 1, 2 и 3 классов в разные годы

Класс повреждения	Годы	2013	2014	2016
1-й	2011	0.66	0.82	0.81
	2013		0.97**	0.79
	2014			0.83
2-й	2011	0.32	0.63	0.71
	2013		0.95*	0.74
	2014			0.78
3-й	2011	0.96**	0.93*	0.73
	2013		0.97**	0.82
	2014			0.92*

Значимость корреляции: * p<0.1; ** p<0.05.

В различных исследованиях отмечается изменение частоты встречаемости точечных и концевых некрозов хвоинок сосны обыкновенной, произрастающей в условиях повышенного техногеного загрязнения [91, 131]. Изменение естественного цвета хвоинок сосны обыкновенной вследствие образования на них многочисленных хлорозов и некрозов является свидетельством нарушения

здорового состояния деревьев под действием стресса. Развитие некрозов не является специфической реакцией на радиационное воздействие. Видимые повреждения листовых органов могут появляться под действием таких стрессовых факторов, как дефицит питания, инвазии насекомых, экстремальные погодные условия и др.

Обнаруженная в 2011 г. корреляция между степенью некротизации хвоинок и уровнем радиоактивного загрязнения, возможно, была связана с сочетанным действием радиационного воздействия и погодных факторов: предыдущий 2010 г., когда формировалась анализируемая хвоя, был аномально жарким. Хроническое радиационное воздействие в неблагоприятных погодных условиях могло оказать модифицирующее, сенсибилизирующее действие на состояние хвои. В зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа был продемонстрирован схожий эффект: погодные условия (температура и количество осадков) оказывали значимое влияние на жизнеспособность семенного потомства растений на радиоактивно загрязнённых территориях, в то время как на фоновых территориях связь между этими показателями не была установлена [100]. Однако, на основе полученных в настоящей работе результатов, можно сделать вывод о том, что наблюдаемый в Брянской и Гомельской областях уровень радиационного воздействия при нормальных погодных условиях оказался недостаточно высок для индуцирования устойчивого, воспроизводимого эффекта либо он был модифицирован другими факторами. Тем не менее, зафиксированы повторяющиеся из года в год феномены – повышенная относительно уровня контрольной популяции частота здоровой хвои на наименее загрязнённых участках и пониженная – на самом радиоактивно загрязнённом участке Брянской области, – которые могут быть следствием хронического радиационного воздействия в малых дозах.

3.1.4 Нарушения морфогенеза хвои в популяциях сосны обыкновенной

После радиационного воздействия в высоких дозах у сосны наблюдаются различные нарушения вегетативных органов: образование морфозов, опадение хвои, изменение её размеров и т.д. [69]. Многохвойные брахибласты, содержащие по 3–5 и более хвоинок в одном пучке, могут встречаться и при длительном произрастании деревьев на территории с низким уровнем радиоактивного загрязнения [33]. В исследуемых популяциях были обнаружены только 3-х хвойные брахибласты [176], которые встречались только на импактных участках (табл. 13). В 2011 г. нарушения развития брахибласт не оценивали. В 2016 г. не было обнаружено ни одного случая морфозов.

Таблица 13 – Частота тройных хвоинок в популяциях сосны обыкновенной, %

Участки	К	К1	ВИУА	СБ	ЗП	ЗК
2013	0	0	0.17 (1)	0	0.50 (3)	0.17 (1)
2014	0	0	0	0	0.33 (2)	0.33 (2)
2016	0	0	0	0	0	0

Примечание. В скобках – количество тройных брахибластов среди 600 просмотренных на участке

K. Boratynska и A. Boratynski [157] указывают, что для вида *Pinus sylvestris* характерна частота встречаемости треххвойных брахибласт, равная 0.1%. В настоящей работе данный признак изменяется в импактных популяциях в пределах от 0.17 до 0.50%, таким образом превышая на одном из наиболее радиоактивно загрязнённых участков естественный уровень встречаемости этого морфоза в 5 раз.

Формирование многохвойных пучков связано с гибелью верхушечной почки. Замещающие побеги, образовавшиеся из спящих почек в год повреждения, с высокой частотой (до 90%) образуют брахибласты с 3-мя хвоинками. Из-за изменения скорости пролиферации меристем заложение зачатков хвои смещается [135].

Таким образом, изучено состояние популяций сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия в малых дозах с помощью оценки морфометрических параметров, индекса флуктуирующей асимметрия, некротированности хвои, морфозов. В импактных популяциях обнаружена повышенная масса хвои относительно одной референтной популяции при разнонаправленном изменении её длины с некоторым уменьшением на участках, подверженных наибольшему воздействию β-излучения. Обнаружена высокая повреждённость хвои некрозом на наиболее радиоактивно загрязнённом участке Брянской области. Выявлено нарушение стабильности развития хвои, проявляющееся в повышенном количестве морфозов и росте индекса ФА по длине хвои сосны, при увеличении дозовой нагрузки. Зависимости индекса ФА по массе от уровня радиационного воздействия не обнаружено.

3.2 Оценка качества пыльцы сосны обыкновенной в условиях хронического облучения

3.2.1 Основные типы тератоморфных пыльцевых зёрен в исследуемых популяциях сосны обыкновенной

Для пыльцы семейства сосновых (за исключением лиственницы, тсуги и псевдо-тсуги) характерны билатерально-симметричные двухмешковые пыльцевые зёрна (рис. 10). Воздушные мешки у них образуются в результате расхождений слоев экзины, пространство между которыми заполнено воздухом.

Обнаружено, что большинство из изученных клеток пыльцы имело нормальное морфологическое строение, а именно, правильное пыльцевое зерно (п.з.) и два воздушных мешка (в.м.) умеренной величины [81]. Среди аномальных форм пыльцевых зёрен *Pinus sylvestris* L. в исследуемых популяциях наиболее часто встречались следующие типы аномалий, проиллюстрированные на рис. 11: пыльцевые зерна линзовидной формы, пыльца с утончённой экзиной, деградирующая пыльца, двумешковые пыльцевые зерна с недоразвитыми воздушными мешками, пыльцевые зерна с редуцированным телом.

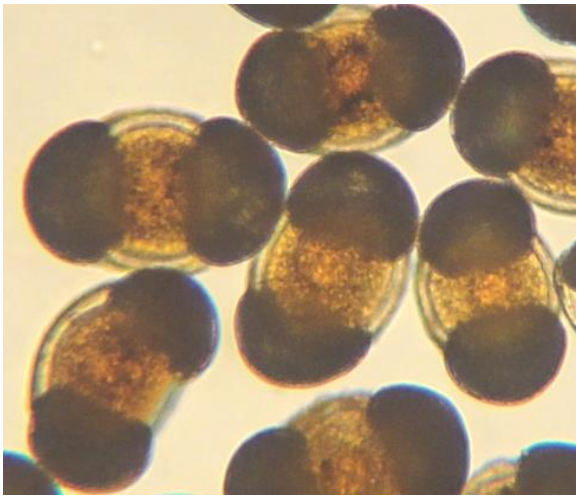

Рисунок 10 – Нормальная пыльца *Pinus sylvestris* L.

Примечание. Здесь и далее приведены фотографии пыльцы, сделанные в ходе данного исследования

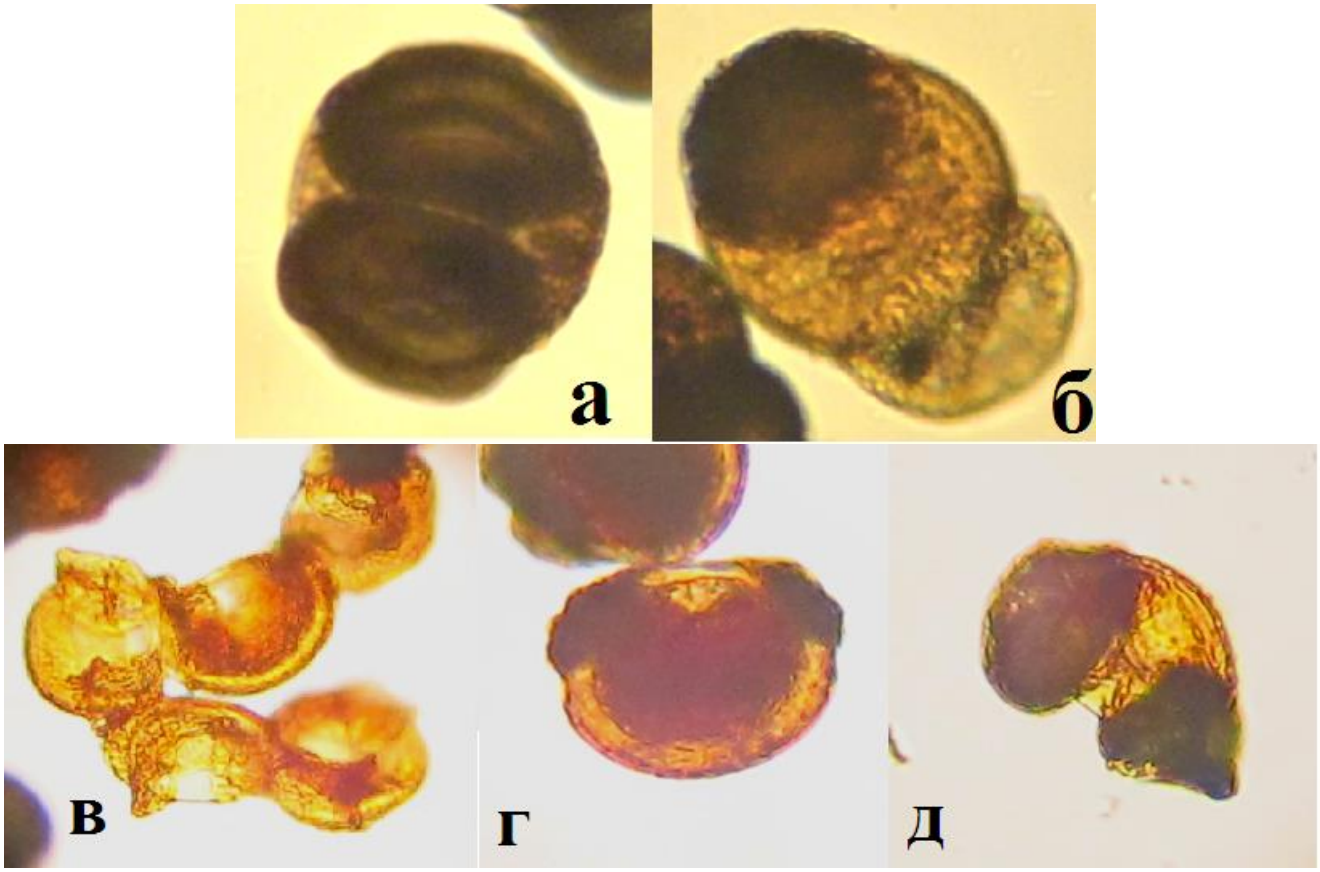

Рисунок 11 – Распростанённые аномальные пыльцевые зёрна сосны обыкновенной: а – п.з. линзовидной формы, б – пыльца с утончённой экзиной, в — деградирующая пыльца, г – двумешковые п.з. с недоразвитыми в.м., д – п.з. с редуцированным телом

Данные о частоте типов аномалий развития пыльцы сосны обыкновенной, произрастающей на референтных и радиоактивно загрязнённых участках Брянской и Гомельской областей, приведены в табл. 14.

На рис. 12 показан относительный вклад данных аномалий за три года исследований.

Таблица 14 – Частота распространённых типов тератоморфных пыльцевых зёрен сосны обыкновенной, оценённая относительно всей пыльцы с участка, %

Тип аномалий	Год	Участок								
		К	К1	ВИУА	СБ	ЗП	ЗК	Кож	Кул	Мас
Линзовидная форма	2013	5.08	4.01	14.25	10.55	4.33	8.07			
	2014	2.10	2.56	3.58	2.81	3.63	10.1			
	2016	4.41	2.72	4.63	2.71	4.76	8.76	14.0	7.09	12.7
Утончённая экзина	2013	1.18	0.75	2.57	1.57	0.91	1.10			
	2014	0.08	0.15	0.21	0.20	0.22	0.17			
	2016	0.29	0.06	0.36	0.19	0.16	0.12	0.42	0.18	0.28
Недоразвитые в.м.	2013	1.64	2.48	2.87	2.16	1.67	1.40			
	2014	0.60	0.74	0.90	0.82	1.02	0.49			
	2016	0.31	0.08	0.21	0.30	0.12	0.33	0.31	0.48	0.24
Деградиру-ющая	2013	0.43	0.57	2.03	1.79	0.65	0.65			
	2014	0.14	0.15	0.17	0.55	0.23	0.08			
	2016	0.19	0.01	0.19	0.08	0.06	0.13	0.15	0.11	0.10
Редуцирован-ное тело	2013	0.38	0.79	0.46	0.43	0.33	1.73			
	2014	0.03	0.14	0.07	0.09	0.21	0.26			
	2016	0.04	0.10	0.09	0.02	0.03	0.18	0	0.11	0.13

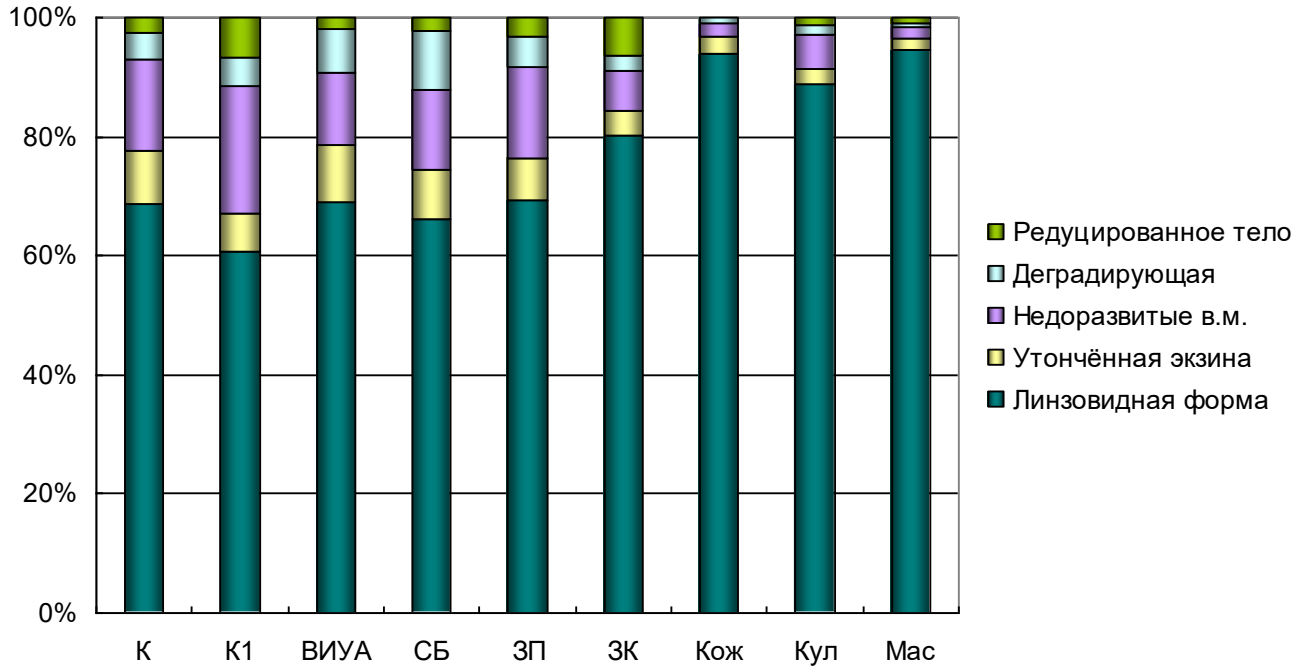

Рисунок 12 – Относительный вклад некоторых типов аномалий пыльцевых зёрен (%), усреднённый за три года

Наиболее распространённой аномалией являются п.з. линзовидной формы, относительный вклад которых в общее число аномалий в 2013 г. составил от 46 до 63%, в 2014 г. – от 62 до 90%, а в 2016 г. – от 81 до 93%. В 2013 г. частота пыльцы линзовидной формы не имела значимой зависимости от показателей радиоактивного загрязнения. Частота п.з. данной формы в 2014 г. коррелировала с расчётными значениями суммарной годовой поглощённой дозы в кронах деревьев (r=0.76, p=0.076) и удельной активностью ^{137}Cs в поверхностном слое почвы 0–5 см (r=0.84, p=0.035). В 2016 г. частота п.з. линзовидной формы коррелировала только с дозой от β-излучения (r=0.92, p=0.0005), удельными активностями ^{137}Cs (r=0.68, p=0.044) и ^{90}Sr (r=0.90, p=0.001) в шишках.

Обнаружена значимая корреляция частоты пыльцевых зёрен с редуцированным телом в 2014 г. и суммарной годовой поглощённой дозой (r=0.83, p=0.039), дозой от β-излучения (r=0.86, p=0.030), удельными активностями ^{137}Cs в почве на глубине 0–5 см (r=0.88, p=0.021), 10–15 см (r=0.98,

p=0.023), удельными активностями ^{137}Cs (r=0.85, p=0.032) и ^{90}Sr (r=0.76, p=0.082) в шишках.

Среди аномалий пыльцы сосны на радиоактивно загрязнённой территории выявлены пыльцевые зёрна с редуцированным телом. Данное нарушение описывают как возможную реакцию на пониженную влажность воздуха, характерную для техногенной среды, когда в ходе микроспорогенеза образуется большое количество пыльцевых зёрен, у которых уменьшается объём тела. На образование мелких пыльцевых зёрен вследствие сухости воздуха в условиях загрязнения указывают многие авторы [31, 83, 126]. В результате потери воды объём живого пыльцевого зерна сокращается, воздушные мешки смыкаются над вминающейся внутрь тела бороздой и закрывают собой наиболее тонкий участок экзины. Эти процессы приводят к снижению испарения и предохраняют пыльцевые зёрна от полного высыхания [93, 97]. В представленной работе хранение пыльцы над $CaCl_2$ согласно методике [24, 119] могло привести к некоторому обезвоживанию п.з., которое способствовало дополнительному равномерному увеличению частоты пыльцы линзовидной формы, сохраняя дозозависимый эффект. Также возможно, что линзовидная форма пыльцы является ранней стадией редуцированного тела.

Частота встречаемости пыльцы с утончённой экзиной и с недоразвитыми воздушными мешками не имела значимой корреляции с уровнем радиационной нагрузки. Частота деградирующей пыльцы значимо коррелировала в 2014 г. с удельной активностью ^{137}Cs в почве на глубине 5–10 см (r=0.85, p=0.033).

Образование выявленных в данной работе пыльцевых зёрен с нарушением экзины наблюдается при неблагоприятной динамике температур воздуха (потепление перед началом пыления и вслед за ним резкое похолодание) [92]. Пыльца с признаками деградации, по результатам данных авторов [92, 126], образуется у представителей хвойных при нарушении развития микроспороцитов зимой, когда во время оттепелей мейоз завершается, и формируются пыльцевые зёрна с тонкой оболочкой. Последующее понижение температуры приводит к массовой деградации молодых пыльцевых зёрен. Такое же явление наблюдается и

весной, когда в результате заморозков микроспоры оказываются неспособными формировать мужской гаметофит. При этом повышенная встречаемость данного типа аномалий развития, тем не менее, более распространена в условиях техногенного загрязнения по сравнению с относительно чистыми контрольными условиями [14, 51, 52].

На рис. 13 представлена частота встречаемости всех тератоморфных форм пыльцевых зёрен на референтных и импактных участках в 2013, 2014 и 2016 гг.. На протяжении всех лет исследования частоты аномалий всех типов в референтных популяциях К и К1 статистически значимо не различались [81]. В 2013 г. на участках ВИУА и СБ частота аномальной пыльцы значимо превышает обе референтные популяции; по всей видимости, это связано с тем, что в этот год отбор образцов в популяциях ВИУА и СБ был проведен на поздней стадии пыления. В последующие два года значимое превышение контрольного уровня наблюдали на участках ВИУА и ЗП ($p<0.05$; $p<0.01$). Популяции, находящиеся на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника характеризуются намного более высокими частотами аномалий пыльцы ($p<0.001$). На площадке Мас наблюдалась высокая дисперсия данного показателя, что позволило установить различие с контролями на более низком уровне статистической значимости ($p<0.05$).

Корреляционный анализ показал отсутствие зависимости частоты тератоморфных пыльцевых зёрен в 2013 г. от используемых показателей радиоактивного загрязнения. В 2014 г. присутствовала значимая корреляция частоты всех типов тератоморфной пыльцы с суммарной дозой ($r=0.82$, $p=0.046$) и с удельной активностью ^{137}Cs в слое почвы 0–5 см ($r=0.89$, $p=0.018$), удельной активностью ^{90}Sr в шишках ($r=0.74$, $p=0.094$). В 2016 г. обнаружена значимая корреляция с дозой от β-излучения ($r=0.91$, $p=0.0005$) и удельной активностью ^{90}Sr в шишках ($r=0.89$, $p=0.001$).

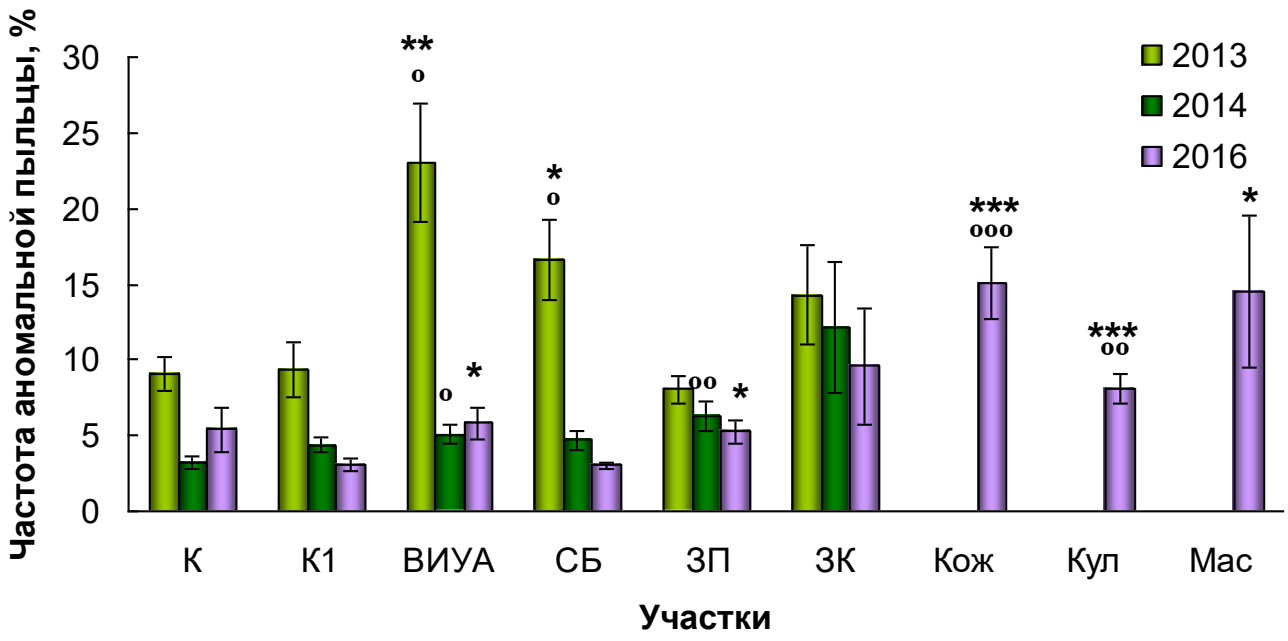

Рисунок 13 – Частота встречаемости тератоморфных пыльцевых зёрен (%) в изучаемых популяциях

^{o}, ^{oo} и ^{ooo} – значимые отличия от контроля К, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, *U*-тест;

*, ** и *** – значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, *U*-тест

На основании полученных данных можно заключить, что хроническое облучение приводит к росту частоты аномальных пыльцевых зёрен у *Pinus sylvestris* L., особенно на участках, загрязнённых *β*-излучающими радионуклидами.

3.2.2 Редкие тератоморфные формы пыльцевых зёрен сосны обыкновенной

Помимо распространённых нарушений развития пыльцы были обнаружены и более редкие формы (рис. 14).

В табл. 15 приведены частоты данных аномалий пыльцевых зёрен *Pinus sylvestris* L., произрастающей в условиях хронического радиационного воздействия. Гипертрофированное п.з. за все годы исследования встречалось только дважды: в 2013 г. в популяции К и в 2016 г. в популяции СБ.

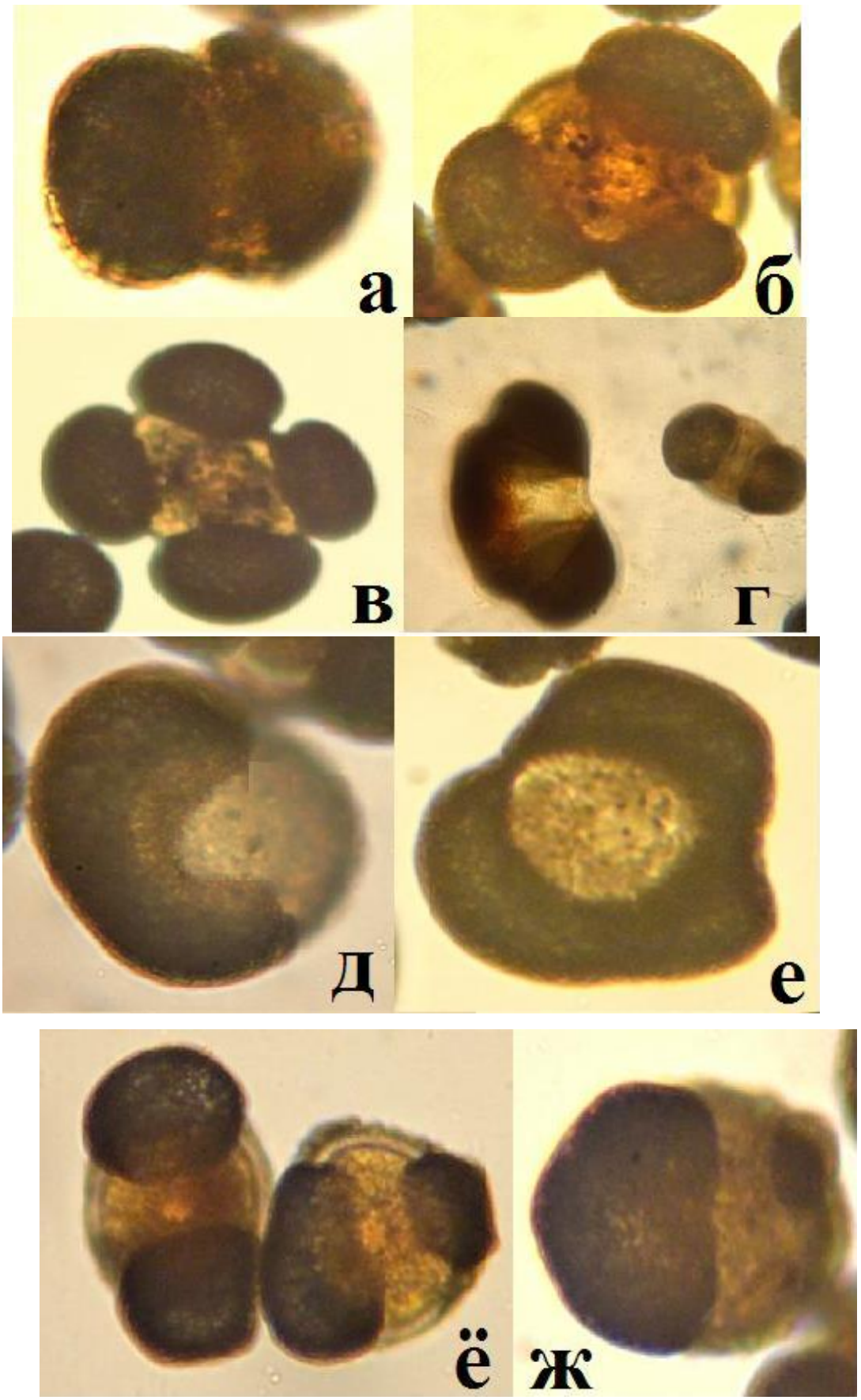

Рисунок 14 – Редкие формы аномальной пыльцы сосны обыкновенной: а, б, в – п.з. с одним, тремя, четырьмя в.м., г – гипертрофированное (диплоидное) п.з., д-е – п.з. воротничковой формы, ё-ж – разномешковые п.з.

Таблица 15 – Частота редких типов тератоморфных пыльцевых зёрен сосны обыкновенной, оценённая относительно всей пыльцы с участка, $*10^{-3}$ %

Тип аномалий	Год	Участок								
		К	К1	ВИУА	СБ	ЗП	ЗК	Кож	Кул	Мас
1 в.м.	2013	116	130	55	55	116	28			
	2014	71	84	51	68	80	27			
	2016	53	10	0	10	0	0	18	10	0
3 в.м.	2013	36	30	18	9	9	9			
	2014	44	84	21	59	60	9			
	2016	0	29	27	0	19	18	0	0	9
4 в.м.	2013	18	0	9	9	0	9			
	2014	0	84	51	29	20	82			
	2016	9	0	0	0	29	9	9	10	0
Воротничковая форма	2013	27	20	0	0	0	9			
	2014	0	0	0	0	0	0			
	2016	18	10	0	0	0	9	0	29	36
Разномешковые п.з.	2013	142	50	27	36	36	9			
	2014	0	53	0	10	20	9			
	2016	36	19	36	29	19	9	9	10	18

Согласно корреляционному анализу, между частотами встречаемости редких форм пыльцы и параметрами радиационного воздействия не выявлено линейной зависимости. Исключения составили п.з. с 3-мя в.м., которые в 2013 г. коррелировали с Dsum (r=-0.87, p=0.023), МЭД (r=-0.74, p=0.093), с удельной активностью ^{137}Cs в слое почвы 0-5 см (r=-0.78, p=0.065) и удельной активностью ^{90}Sr в шишках (r=-0.91, p=0.011). Также исключением является воротничковая форма пыльцы, проявившая в 2016 г. корреляцию с Dα (r=0.87, p=0.003), Dsum (r=0.80, p=0.010), МЭД (r=0.69, p=0.041) и удельной активностью ^{137}Cs в шишках (r=0.77, p=0.016).

Данные аномальные формы пыльцевых зёрен отличаются нарушением развития воздушных мешков. Как показали исследования [124], развитый воздушный мешок выполняет не столько функцию летательного аппарата, сколько гармомегата, то есть при помощи него регулируется объём пыльцевого зерна в зависимости от содержания в нем влаги. В качестве летательного аппарата они, по-видимому, были использованы вторично. Асимметричность, как и наличие только одного или двух недоразвитых воздушных мешков, приводит к нарушению лётных свойств, а также снижает парусность пыльцы. Такие морфотипы достаточно часто встречаются в изученных образцах пыльцы сосны и не могут выполнять адаптивную функцию, их можно рассматривать как признак нестабильности развития [128]. Появление же многомешковой пыльцы у хвойных в условиях техногенного загрязнения может быть связано с необходимостью увеличения летучести пыльцевых зёрен [83, 84]. Такая пыльца развивается у представителей родов *Pinus* и *Piceae* только в экстремальных условиях среды [124].

3.2.3 Заключение к разделу об аномалиях пыльцы сосны обыкновенной

Поскольку пыльца растений несёт гаплоидный набор наследственной информации, то является более чувствительным звеном в отношении повреждающих факторов по сравнению с диплоидными клетками, имеющими большие возможности для репарации повреждений. Поэтому выбранный в работе показатель аномальных форм пыльцевых зёрен может изменяться под действием меньших доз и уровней техногенных факторов, в том числе радиоактивного загрязнения, на фоне других показателей, используемых в биологическом мониторинге [99, 172].

Тератогенез пыльцы сосны обыкновенной оценивался рядом авторов, изучавших воздействие аэрополлютантов на состояние мужской генеративной сферы растений. В исследовании И.Н. Третьяковой и Н.Е. Носковой [126] показано, что в лесных массивах г. Красноярска и его окрестностей, аэрогенное

геохимическое загрязнение которых находится в диапазоне от низкого до чрезвычайно опасного, аномалии пыльцы у отдельных деревьев сосны достигают 21–42%. В работе И.С. Гайдыш [18] обнаружено, что в г. Костомукша и на его окраине уровень аномальной пыльцы у сосны составил 52–61% и 32–42%, соответственно; в результате деятельности Костомукшского горно-обогатительного комбината в атмосферу выбрасывается 45.6 тыс. т/год загрязняющих веществ, из которых 82% занимает диоксид серы – один из наиболее опасных поллютантов для хвойных растений. Таким образом, довольно высокие уровни тератогенеза пыльцы, обнаруженные в настоящем исследовании, превышающие уровень естественного полиморфизма у сосны обыкновенной (3–7%) [32] в 2–3 раза, не являются необычными в условиях антропогенного воздействия.

В условиях экологического стресса встречается широкий спектр аномалий пыльцы сосны: «карлики», «гиганты», тетрады и полиады, деградирующая пыльца, утолщённая и утончённая экзина, опухолевоподобные «новообразования» на теле и мешках, редуцированное тело или в.м., линзовидная и воротничковая форма, «бахрома» вместо воздушных мешков, разномешковые, пыльцевые зёрна с 1-им, 3-мя, 4-мя, 5-ю в.м. или без них [13, 51, 95, 128]. В данной работе на территории Брянской и Гомельской области обнаружены только некоторые из указанных аномалий.

В исследованиях, проведённых на территории Брянской и Гомельской областей, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, показана высокая вариабельность аномальной пыльцы в зависимости от года и опытного участка. Известно, что качество пыльцы сильно меняется в зависимости от многих факторов: погодных условий, состояния и генотипических особенностей дерева [87, 98, 106], а также от сроков сбора пыльцы [125]. Именно сбор материала на поздних сроках пыления, вероятно, привёл к высокому уровню аномалий в 2013 г. на участках ВИУА и СБ.

Согласно другим исследованиям [132], при рассмотрении влияния на изменчивость различных признаков пыльцы сосны обыкновенной вклада таких

факторов, как погодные условия, точка сбора материала, характеризующая экологическое состояние среды, их взаимодействие и случайные факторы, обнаружено, что ведущим фактором является место произрастания. Вклад данного фактора в общую фенотипическую изменчивость составил 33–73 %. Это объясняет, почему в последующие годы наблюдается влияние и радиационного фактора, проявляющееся в повышенной частоте аномальных пыльцевых зёрен. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [113], где спустя 15 лет после аварии на ЧАЭС, в 2000–2001 гг., пониженная жизнеспособность пыльцы и повышенное число аномальных пыльцевых зёрен наблюдались на участках с мощностью дозы 1.8–5.4 мкГр/ч. Вариабельность исследуемого признака возрастает на наиболее загрязнённых участках ЗК, Кож, Мас. Таким образом, наблюдается усиление мутационных процессов, обнаруженное в условиях хронического облучения на пыльце сосны и в других работах [24, 113].

Известно, что возврат ^{137}Cs в почву с опадом в сосняках Брянского Полесья на подзолистых почвах легкого гранулометрического состава в 1.2 раза ниже, чем его годовое накопление в фитомассе [134]. Исследованные в данной работе сосновые популяции произрастают на радиоактивно загрязнённых территориях около 30 лет, поэтому в вегетативных и репродуктивных органах этих деревьев можно ожидать накопления высоких концентраций радионуклидов.

Сосна по величине коэффициента перехода ^{90}Sr и ^{137}Cs из почвы в растение занимает третье место среди древесных пород после осины и берёзы [124]. Усвоение ^{90}Sr растением из почвы происходит приблизительно в 10–100 раз интенсивнее, чем накопление ^{137}Cs [124, 125]. Это обстоятельство связано с тем, что ^{90}Sr находится в почве преимущественно в подвижных формах и может интенсивно накапливаться в растениях, тогда как большинство других радионуклидов усваивается корневыми системами в меньших количествах [91]. В том числе, для древесных растений интенсивность поступления ^{137}Cs корневым путем ниже, чем ^{90}Sr, так как ^{137}Cs прочнее фиксируется в лесной почве, вследствие чего его доступность для корневых систем снижается [76]. Однако на

исследуемых территориях основным дозообразующим радионуклидом является ^{137}Cs, его удельные активности в шишках примерно на порядок выше, чем ^{90}Sr. Поэтому оба радионуклида вызывают значимое биологическое действие на различные показатели состояния популяции.

В целом интересно отметить, что результаты работы в 2014 и 2016 гг. по оценке состояния пыльцы сосны в условиях хронического радиационного воздействия находятся в соответствии с данными по морфометрическим параметрам хвои, проявляя высокую зависимость от β-излучающих радионуклидов.

3.3 Определение генетического полиморфизма в популяциях сосны

3.3.1 Оценка параметров генетического разнообразия с использованием AFLP-маркёров

В результате проведённого исследования 135 образцов тотальной ДНК были успешно амплифицированы, и выявлены 184 фрагмента ДНК, пригодные к использованию в дальнейшем анализе. Обнаружено, что число полиморфных локусов в популяциях варьирует от 90 до 148 (табл. 16), их частота имеет тенденцию к увеличению при росте суммарной годовой дозы (r=0.65; p=0.079).

Среднее генетическое разнообразие на локус по Неи статистически значимо превышает контрольный уровень на участках СБ, ЗП, Кул (p<0.01), Кож (p<0.05) (табл. 16). Данный параметр не имел значимой корреляции с исследуемыми показателями уровня радиационного воздействия по всем участкам, в том числе с Dsum (r=0.62; p=0.104), но если рассматривать только участки Брянской области, то наблюдается значимая зависимость от суммарной дозы (r=0.87; p=0.053) [248].

Таблица 16 – Встречаемость полиморфных локусов и среднее генетическое разнообразие по Неи

Участок	Годовая доза, мГр	Число полиморфных локусов	Полиморфные локусы, %	Среднее генетическое разнообразие на локус по Неи
К1	0.90	110	59.8	0.219
ВИУА	10.7	90	48.9	0.214
СБ	20.1	115	62.5	0.247**
ЗП	33.8	110	59.8	0.248***
ЗК	39.3	132	71.7	0.251
Кож	19.4	137	74.5	0.264*
Кул	102.4	148	80.4	0.270***
Мас	129.2	134	72.8	0.256

*, ** и *** - значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$, *U*-тест

Между исследуемыми популяциями сосны обыкновенной, произрастающими на радиоактивно загрязнённых территориях, рассчитывали генетическое расстояние по Неи, которое варьирует в достаточно широких пределах: от 0.0050 до 0.0422, составляя в среднем 0.0185. В табл. 17 представлены показатели генетической идентичности, определяющие в двух популяциях доли генов, тождественных друг другу, а также генетическое расстояние, измеряющее в двух популяциях или видах числа замен аллельных последовательностей, приходящихся на один локус, которые произошли в результате эволюционных процессов при их разделении [61].

Таблица 17 – Показатели генетической идентичности (над диагональю) и генетическое расстояние (под диагональю) по Неи

Участки	Кож	Кул	Мас	К1	СБ	ВИУА	ЗП	ЗК
Кож		0.990	0.992	0.959	0.960	0.973	0.976	0.980
Кул	0.010		0.993	0.968	0.968	0.980	0.986	0.983
Мас	0.008	0.007		0.976	0.976	0.983	0.981	0.986
К1	0.042	0.033	0.024		0.995	0.994	0.979	0.983
СБ	0.041	0.032	0.025	0.005		0.993	0.980	0.987
ВИУА	0.028	0.020	0.017	0.007	0.007		0.991	0.992
ЗП	0.024	0.015	0.020	0.021	0.020	0.009		0.987
ЗК	0.021	0.017	0.014	0.017	0.013	0.009	0.013	

На основе матрицы генетических расстояний по Неи была построена дендрограмма (рис. 15), демонстрирующая выраженную кластеризацию исследуемых популяций по Брянской и Гомельской областям, но в пределах данных географических подгрупп экспериментальные участки чётко подразделяются по уровням радиационного воздействия [248]. Это согласуется с результатами работ [50, 175, 247], где, используя электрофоретический анализ изоферментов, обнаружено, что генетические расстояния между популяциями, произрастающими на наиболее загрязнённых радионуклидами участках, и популяциями, произрастающими на менее загрязнённых и контрольных участках, сильно различаются.

Таким образом, радиационное воздействие в малых дозах вносит вклад в кластеризацию популяций, хотя географический фактор играет более существенную роль в генетическом подразделении данных популяций.

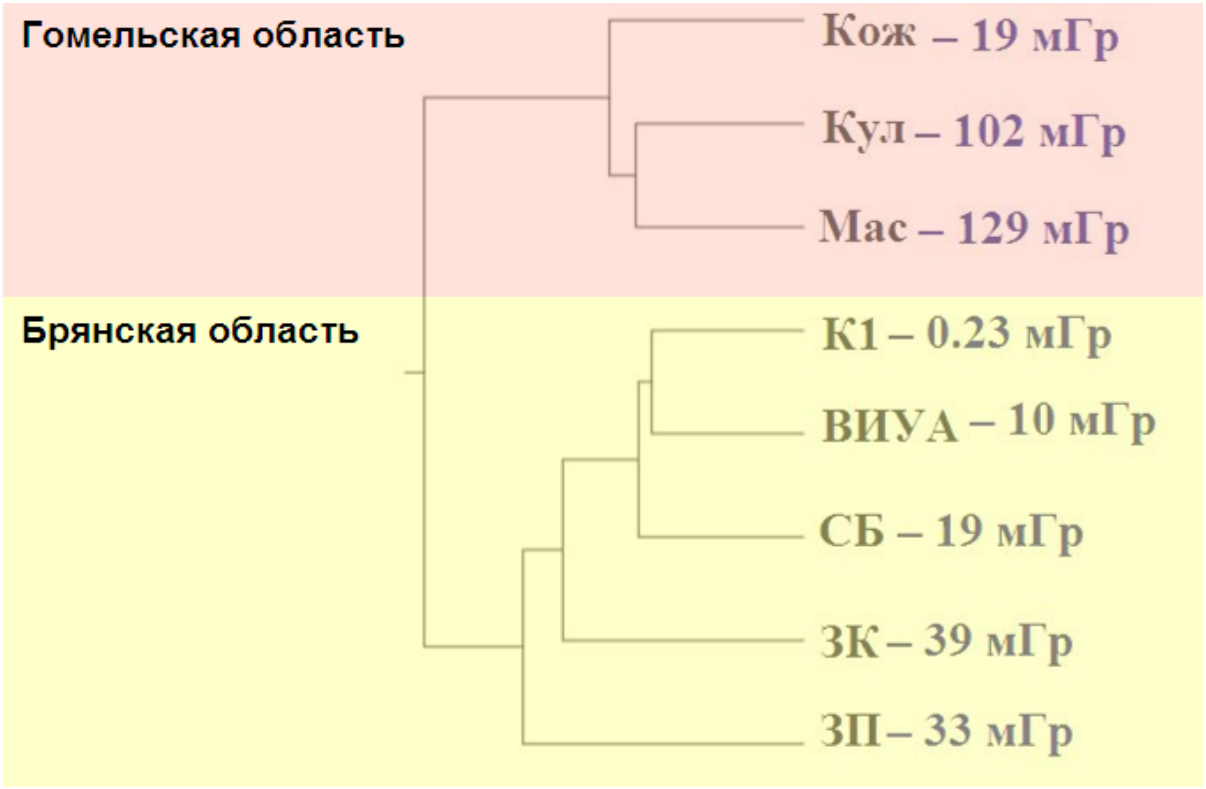

Рисунок 15 – Дендрограмма на основе матрицы генетических расстояний по Неи

Природные популяции сосны обыкновенной в Финляндии, которые не подвергались воздействию радиации, но испытывают воздействие экстремальных климатических условий, не различаются по разным маркёрам ДНК [185]. Для этих участков относительная генетическая дифференциация между популяциями составляла в среднем 0.02 для всех однолокусных маркёрных групп, что указывает на низкое генетическое разнообразие популяций сосны обыкновенной, растущих в естественных неблагоприятных условиях. В настоящем исследовании популяции сосны из России и Беларуси, находясь на расстоянии 200 км, генетически разделены сильнее, чем наиболее отдалённые исследуемые популяции в Финляндии на расстоянии 1000 км [185]. Известно, что генетическая дифференциация популяций растений зависит от множества факторов: вида, типа леса, географического положения, типа и интенсивности антропогенного воздействия, а также других экологических факторов [152]. Результаты работы [44] показывают, что экологические условия произрастания на 75% определяют генетическую дифференциацию популяций, тогда как на географический фактор приходится не более 15% генетических различий. Согласно полученным в данной

работе результатам, географическое местоположение влияет на разбиение популяций, но в пределах географических подгрупп экспериментальные участки чётко подразделяются в зависимости от уровня радиационного воздействия.

3.3.2 Анализ частоты и спектра мутаций в хвое сосны с использованием AFLP-маркёров

Основной пул мутаций, выявленных в эксперименте, составляют нулевые варианты, частота которых в 1.4–7.5 раз выше, чем мутаций, изменяющих электрофоретическую подвижность. В свою очередь, частота мутаций, изменяющих ЭФП, во всех облучаемых популяциях в 1.5–2.8 раза выше, чем в контроле (табл. 18).

Таблица 18 – Число полученных локусов и мутаций в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной

Участок	Число локусов	Число нуль-мутаций	Число изменений электрофоретической подвижности
К1	2576	30	4
ВИУА	2208	26	7
СБ	2024	32	7
ЗП	2208	25	7
ЗК	2760	25	9
Кож	3128	24	6
Кул	3496	15	11
Мас	3128	24	9

Если рассмотреть процент, который занимают изменения электрофоретической подвижности от общего числа мутаций, то обнаруживается значимое превышение относительно контрольного уровня данного показателя на

участках ВИУА, ЗП, ЗК, Кул (табл. 19) [248]. Следовательно, спектр мутаций на загрязнённых участках отличается от контрольного и характеризуется повышенным вкладом изменений электрофоретической подвижности в общее число мутаций.

Таблица 19 – Частота мутаций в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной

Участок	Частота нуль-мутаций, %	Частота изменений электрофоретической подвижности, %	Изменения электрофоретической подвижности от общего числа мутаций, %	Общая частота мутаций
К1	0.0116	0.0015	11.8	0.0132
ВИУА	0.0118	0.0032	21.2*	0.0149
СБ	0.0158	0.0035	17.9	0.0193
ЗП	0.0113	0.0032	21.9*	0.0145
ЗК	0.0091	0.0026	26.5*	0.0123
Кож	0.0077	0.0019	20.0	0.0096
Кул	0.0043	0.0031	42.3**	0.0074
Мас	0.0077	0.0029	27.3	0.0101

* и ** - значимые отличия от контроля К1, $p<0.05$ и $p<0.01$, тест хи-квадрат

В популяциях *Pinus sylvestris* L., произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях, выявлена корреляция на уровне тенденции частоты нуль-мутаций с Dsum (r=-0.67, p=0.072) и мощностью экспозиционной дозы (r=-0.70, p=0.051). Частота изменений электрофоретической подвижности не проявила зависимости от показателей уровня дозовой нагрузки. Однако частота данного типа мутаций среди их общего количества показала значимую корреляцию с Dsum (r=0.72, p=0.046), Dγ (r=0.73, p=0.038), мощностью экспозиционной дозы (r=0.79, p=0.019) и удельной активностью ^{137}Cs в слое почвы 0–5 см (r=0.70, p=0.054).

В работе [201] было показано, что воздействие радиации увеличивает скорость мутаций в AFLP-локусах в природных популяциях сосны обыкновенной в районе Чернобыльской аварии. После анализа AFLP было обнаружено статистически значимое отличие (p<0.0001) для 20-летних деревьев, посаженных после аварии с признаками незначительного и тяжёлого облучения, и испытывавших только хроническое облучение, в 3.5 и 3.8 раза, соответственно, по сравнению с контрольной группой того же возраста. Данные результаты показывают, что AFLP может применяться в качестве дополнительной маркерной системы для обнаружения мутационных событий при изучении влияния ионизирующего излучения.

Ранее для изучаемых сосновых популяций Брянской области была обнаружена сильная корреляция между частотой мутаций для 14 изоферментных локусов в эндоспермах сосны и дозой, поглощённой сосновыми кронами, при этом основной вклад вносили нуль-мутации [247]. Однако данные AFLP-анализа в текущей работе не показали значимого роста количества нуль-мутаций с уровнем радиационного воздействия. Следует отметить, что AFLP-маркёры являются доминантными, требующими двух мутационных событий для выявления гомозиготной нуль-мутации. Напротив, для кодоминантных маркёров, таких как изоферменты, одно мутационное событие будет достаточным для выявления нуль-мутации. Примечательно, однако, что хроническое облучение приводит к увеличению процента изменения электрофоретической подвижности от общего числа мутаций, обнаруженных методом AFLP. Этот результат согласуется с наблюдаемой повышенной скоростью изменений электрофоретической подвижности для изоферментных маркёров с тех же радиоактивно загрязнённых участков в Брянской области [247]. Причины изменений электрофоретической подвижности, тем не менее, различны: для изоферментных маркёров структура белка изменяется из-за однонуклеотидного полиморфизма или внутригенной рекомбинации [237], тогда как для AFLP длина фрагмента ДНК изменяется из-за замещения оснований на участках рестрикции фермента или из-за инсерции [224]. Наблюдения за спонтанными мутациями при

SSR показали, что на процесс мутации влияют различные факторы, включая размер аллеля, повторяющийся мотив, содержание ГЦ-пар в ДНК, деление клеток (митотический или мейотический процесс), положение хромосом, генотип и пол [168].

Незначительно вредные и нейтральные мутации могут быть распространены среди популяций и сохраняться в течение длительных периодов времени, что в конечном итоге влияет на жизнеспособность и плодовитость популяций. Таким образом, высокий уровень мутагенеза может оказывать негативное влияние и приводить к снижению средней приспособленности популяций. С другой стороны, повышенные частоты мутаций могут быть основой адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды и, в частности, к хроническому радиационному воздействию.

Из представленных результатов следует, что параметры генетического разнообразия и частота мутаций в природных популяциях являются чувствительными и информативными критериями при оценке генетических последствий хронического облучения в малых дозах.

Перемены в условиях окружающей среды, такие как глобальное изменение климата, химическое и радиоактивное загрязнение влияют на генетику природных популяций по-разному. В ответ на них включены многие взаимодействующие биологические механизмы, которые в конечном итоге способствуют выживанию организма или популяции. Стрессовые условия окружающей среды могут влиять на генетические системы на разных уровнях биологической организации [154]. На молекулярном уровне взаимодействие стрессовых факторов с ДНК будет создавать соматические поражения, которые могут вызывать повреждение клеток или тканей и оказывать сильное воздействие на здоровье индивидов. Это может повлиять на репродуктивную способность или привести к высоким уровням смертности, что, в свою очередь, может привести к снижению размера популяций и генетической изменчивости популяций. В конечном итоге это может способствовать снижению средней приспособленности популяций или адаптации их к новой среде путём выживания и размножения индивидов с наиболее

подходящими характеристиками. Следовательно, возникновение эффектов на молекулярном уровне может также инициировать каскад ответов на более высоких уровнях, включая физиологические процессы на уровне организма, репродуктивность, демографию популяций, генетику популяций и, наконец, эволюционные процессы, в том числе появление адаптированных популяций с некоторыми уникальными особенностями [154, 241].

Хотя биологические последствия наблюдаемых изменений все ещё остаются предметом обсуждения, можно заключить, что более высокая частота мутаций и среднее генетическое разнообразие на локус по Неи на радиоактивно загрязнённых участках по сравнению с референтными может отражать процесс адаптации к продолжительным стрессовым условиям. Такое увеличение генетической и фенотипической изменчивости является одной из наиболее важных тенденций среди популяций в процессе адаптации к умеренному стрессу [173, 213, 234].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Радиоактивное загрязнение – один из факторов, привлекающих особое внимание экологов в России, Беларуси и Украине. При этом большую научную ценность имеют данные, позволяющие понять, какие биологические эффекты могут проявиться в природных популяциях растений и животных, длительное время и, может быть даже на протяжении многих поколений, испытывающих хроническое облучение в невысоких дозах в естественной среде обитания. Уникальные условия для изучения таких эффектов существуют на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате крупных радиационных аварий, таких как Чернобыльская.

Близкая радиочувствительность клеток сосны и человека, широкий ареал распространения, информативность, технологичность и чувствительность методик тестирования выдвинули сосну обыкновенную в число основных природных тест-объектов эколого-генетического мониторинга. Для выяснения механизмов адаптации живых организмов к неблагоприятным воздействиям среды необходимо изучать ответные реакции на разных уровнях биологической организации — от молекулярного до экосистемного. Данная работа является частью комплексного исследования, затрагивающего разные уровни организации, по оценке радиобиологических эффектов хронического воздействия на популяции сосны обыкновенной, произрастающие в зоне следа аварии на Чернобыльской АЭС. С 2003 г. и по настоящее время лабораторией экотоксикологии и радиобиологии растений ВНИИРАЭ проводится изучение биологических эффектов в популяциях *Pinus sylvestris* L. на шести участках в Брянской области, а с 2016 г. – и на 3-х участках в Гомельской области, которые значительно отличаются уровнями радиоактивного загрязнения. Мощность экспозиционной дозы на максимально загрязнённых участках достигает 444 мкР/час; удельная активность ^{137}Cs в почве в сотни раз превышает контрольные уровни. Изучавшиеся в данной работе популяции сосны обыкновенной в течение долгого

времени произрастают на радиоактивно загрязнённых территориях и испытывают дозовые нагрузки до 130 мГр/год.

Такой диапазон доз хронического облучения представляет особый интерес с точки зрения обоснования предельно допустимых уровней радиационного воздействия на живую природу. По оценкам международного проекта ERICA, годовая доза около 100 мГр может рассматриваться как предел безопасного уровня хронического облучения для всех групп организмов, составляющих обобщенную наземную экосистему [169]. МКРЗ предлагает рассматривать диапазон 40–400 мГр/год в качестве скринингового при хроническом облучении сосны как референтного вида [180]. При установлении этих пределов предполагается предотвратить или ограничить негативное действие облучения на наиболее чувствительные популяции, виды или биоценозы по показателям популяционного, надорганизменного уровня (в первую очередь, через сохранение биоразнообразия), которые предлагается оценивать через отсутствие угнетающего действия радиации на продолжительность жизни и репродуктивную способность природных популяций. Однако рекомендации относительно дозовых нагрузок, не вызывающих негативных изменений морфологических, физиологических и генетических показателей в природных популяциях, в настоящее время отсутствуют. В данной работе показано, что при годовых дозах хронического облучения до 130 мГр у сосны обыкновенной можно выявить ряд генетических и морфологических изменений. Это служит подтверждением того, что доза около 100 мГр/год может рассматриваться как «пограничный» уровень безопасного воздействия на хвойные растения.

Основной массив предыдущих исследований, проведенных на данных популяциях сосны, был посвящён изучению ферментов и хромосомных аберраций. Было показано, что в хронически облучаемых популяциях сосны на радиоактивно загрязнённых территориях Брянской и Гомельской областей при относительно невысоких уровнях воздействия (10–130 мГр в год) даже спустя 30 лет после аварии регистрируется значимое увеличение генетической и цитогенетической изменчивости, причем наблюдаемые эффекты демонстрируют

зависимость от уровней радиоактивного загрязнения участков и дозовых нагрузок на популяции [21–23, 175, 247].

Однако анализ эффектов хронического облучения на более высоких уровнях биологической организации ранее проводился в недостаточной степени. В настоящей работе изучены закономерности формирования нарушений морфометрических и репродуктивных характеристик сосны обыкновенной на примере флуктуирующей асимметрии, длины и массы хвои, частоты некрозов и морфозов, а также аномалий развития пыльцы. Используя более современные методы анализа, чем применяемые ранее для исследования изоферментного полиморфизма, было выявлено увеличение частоты мутаций и параметров генетического разнообразия.

Метод оценки морфометрических показателей и состояния хвои достаточно информативен, прост и воспроизводим. Различия между сторонами, которые наблюдаются при флуктуирующей асимметрии, могут быть определены по своей природе как следствие несовершенства онтогенетических процессов и, в общем виде, диагностированы как проявление случайной изменчивости развития. ФА может быть охарактеризована как одно из наиболее обычных, и главное, доступных для анализа проявлений нарушения стабильности развития.

Использование пыльцы в качестве биоиндикаторов тератогенеза также имеет ряд достоинств. Одним из них является высокая чувствительность, обусловленная гаплоидным состоянием, при котором все летальные мутации, влияющие на развитие пыльцы, сразу доступны для наблюдения. Большое количество пыльцы обеспечивает достаточную выборку для количественной оценки результатов. Метод оценки тератоморфной пыльцы чувствительный и очень экономичный.

AFLP-маркёры являются чувствительным и полезным инструментом для изучения изменений скоростей мутаций и генетической структуры популяций при радиационном воздействии. Подобные работы вносят существенный вклад в понимание генетических основ адаптации природных популяций к неблагоприятным условиям среды. Важность исследования генетических

эффектов связана с их индуцированием при значительно меньших дозах, чем другие радиобиологические эффекты, а также тем, что время их восстановления намного превосходит время восстановления последних.

Используемые подходы представляются перспективными для оценки и мониторинга состояния природных популяций разных видов, а также для оценки качества среды. Изучение жизнедеятельности фитоценозов способствует совершенствованию принципов и норм допустимого техногенного воздействия на природные экосистемы. Полученные в настоящей работе результаты говорят о том, что при хроническом радиационном воздействии на сосну обыкновенную в дозах около 100 мГр в год и выше могут проявляться последствия облучения. Обнаружено повышение массы хвои при снижении её длины, рост асимметрии хвои и поражения её некрозом, повышенное количество морфозов. Выявлены устойчивые радиационно-зависимые эффекты при оценке качества пыльцевых зёрен. Обнаружено изменение частоты мутаций, рост генетического разнообразия и влияние радиоактивного загрязнения на генетическую дифференциацию популяций. Зависимости этих показателей от дозы излучения свидетельствует о высокой биологической эффективности действия хронического облучения в малых дозах.

В целом, это исследование ещё раз продемонстрировало важность оценки реакции живых существ на антропогенное воздействие с использованием разных подходов на разных уровнях биологической организации.

ВЫВОДЫ

1. В популяциях сосны обыкновенной, испытывающих хроническое радиационное воздействие с мощностью дозы до 130 мГр/год, изменения морфологических параметров хвои, в основном, не проявляют статистически значимой зависимости от годовой поглощённой дозы в кронах деревьев, МЭД, удельных активностей ^{137}Cs в почве,^{137}Cs и ^{90}Sr в шишках.

2. Флуктуирующая асимметрия длины хвои может возрастать при увеличении годовой поглощённой дозы, что свидетельствует о нарушении стабильности развития растений на радиоактивно загрязнённых территориях; аналогичный показатель по массе хвои, однако, не выявил зависимости от уровня радиационного воздействия.

3. На участке Брянской области с наиболее высоким уровнем поглощённой дозы (39 мГр) повышена частота хвои, сильно поражённой некротическими пятнами. В Брянской области трёххвойные брахибласты обнаружены только в популяциях, произрастающих на радиоактивно загрязнённых участках.

4. В изучаемых популяциях сосны выявлены разнообразные тератоморфные формы пыльцевых зёрен. Частота аномальной пыльцы на большинстве участков, испытывающих радиационное воздействие, значимо превышает уровень контрольных популяций и увеличивается в 2014 г. с суммарной поглощённой дозой (r=0.82, p=0.046), в 2016 г. – с поглощённой дозой β-излучения (r=0.91, p=0.0005).

5. При хроническом радиационном воздействии в популяциях сосны обыкновенной наблюдается тенденция к увеличению числа полиморфных AFLP локусов с ростом годовой поглощённой дозы. Среднее генетическое разнообразие на локус по Неи статистически значимо превышает контрольный уровень на большинстве изучаемых радиоактивно загрязнённых участков Брянской и Гомельской областей. Исследуемые популяции при анализе генетических расстояний между ними разделяются на два географических кластера, в пределах

которых экспериментальные участки чётко подразделены по уровням радиационного воздействия. Относительная частота изменения электрофоретической подвижности повышена на радиоактивно загрязнённых участках Брянской и Гомельской областей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абатуров, Ю.Д. Влияние ионизирующего излучения на сосновые леса в ближайшей зоне Чернобыльской АЭС / Ю.Д. Абатуров, А.В. Абатуров, А.В. Быков и др. – М.: Наука, 1996. – 240 с.

2. Алекперов, У.К. Антимутагенная модификация аберрации хромосом и флуктуирующей асимметрии / У.К. Алекперов, У.Ф. Гашимова, А.О. Мамедова, Р.Р. Гаджиев // Доклады академии наук. Генетика. – 1992. – Т. 325. – № 3 – С. 602–605.

3. Алексахин, Р.М. Крупные радиационные аварии: последствия и защитные меры / Р.М. Алексахин, Л.А. Булдаков, В.А. Губанов и др.; под общ. ред. Л.А. Ильина и В.А. Губанова. – М.: ИздАТ, 2001. – 752 с.

4. Алексеев, В.А. Влияние загрязнения на изменение морфоструктуры деревьев / В.А. Алексеев, И.В. Лянгузова // Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. – Л.: Наука, 1990. – С. 87–94.

5. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях: учебное пособие / Ю.П. Алтухов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Академкнига, 2003. – 431 с.

6. Атлас современных и прогнозных аспектов последствий аварии на Чернобыльской АЭС на пострадавших территориях России и Беларуси (АСПА Россия-Беларусь) / под ред. Ю.А. Израэля, И.М. Богдевича. – Москва: Фонд «Инфосфера» – НИИ-Природа; Минск: Белкарография, 2009. – 140 с.

7. Аугустайтис, А.А. Особенности формирования надземной фитомассы сосновых молодняков в условиях загрязнения природной среды // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. – 1989. – Т. 12. – С. 32–51.

8. Афанасьева, Л.В. Элементный состав хвои и морфологические параметры сосны обыкновенной в условиях атмосферного промышленного загрязнения в западном Забайкалье / Л.В. Афанасьева, В.К. Кашин, А.С. Плешанов и др. // Хвойные бореальные зоны. – 2004. – Вып. 2. – С. 112–119.

9. Басова, С.В. Лесопатологическое исследование сосны обыкновенной в условиях техногенного загрязнения / С.В. Басова // Проблемы лесоведения и лесоводства. – 2001. – № 53. – С. 307–309.

10. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / под ред. Р. Шуберта. – М.: Мир, 1988. – 348 с.

11. Бурлакова, Е.Б. Эффект сверхмалых доз / Е.Б. Бурлакова // Вестник РАН. – 1994. – Т. 64. – № 5. – С. 425–431.

12. Василевская, Н.В. Оценка стабильности развития популяций *Pinus sylvestris* L. в условиях аэротехногенного загрязнения (Мурманская область) / Н.В. Василевская, Ю.М. Тумарова // Труды Карельского научного центра РАН. Серия Б. Биогеография Карелии. – 2005. – Вып. 7. – С. 7–11.

13. Василевская, Н.В. Морфологическая изменчивость пыльцы *Pinus sylvestris* L. в условиях промышленного города (на примере г. Мончегорска) / Н.В. Василевская, Н.В. Петрова // Учёные записки Петрозаводского государственного университета. – 2014. – № 4 (141). – С. 7–12.

14. Василевская, Н.В. Полиморфизм пыльцы *Pinus sylvestris* L. и *Larix sibirica* ledeb. города Мурманска / Н.В. Василевская, А.Д. Домахина // Учёные записки Петрозаводского государственного университета. – 2016. – № 4 (157). – С. 13–20.

15. Волкова, П.Ю. Анализ полиморфизма супероксиддисмутазы в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной / П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52. – № 4. – С. 370–380.

16. Воробейчик, Е.Л. Воздействие точечных источников эмиссии поллютантов на наземные экосистемы: методология исследований, экспериментальные схемы, распространённые ошибки / Е.Л. Воробейчик, М.В. Козлов // Экология. – 2012. – № 2. – С. 83–91.

17. Гавриков, Д.Е. Методика оценки стабильности развития на примере берёзы (*Betula pendula*) / Д.Е. Гавриков // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – №2 (48). – С. 13–17.

18. Гайдыш, И.С. Биоиндикация природной среды малого северо-таёжного промышленного города: на примере г. Костомукша: автореф. дис. ... канд. биолог. наук: 03.02.08. / Гайдыш Ирина Сергеевна. – Петрозаводск, 2012. – 23 с.

19. Гераськин, С.А. Статистические методы анализа эмпирических распределений коэффициентов накопления радионуклидов растениями / С.А. Гераськин, С.В. Фесенко, Л.Г. Черняева, Н.И. Санжарова // Сельскохозяйственная биология. – 1994. – № 1. – С. 130–137.

20. Гераськин, С.А. Универсальный характер закономерностей индукции цитогенетических повреждений низко дозовым облучением и проблема оценки генетического риска / С.А. Гераськин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39. – №. 1. – С. 35–40.

21. Гераськин, С.А. Цитогенетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС / С.А. Гераськин, Н.С. Дикарева, А.А. Удалова и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48. – № 5. – С. 584–595.

22. Гераськин, С.А. Особенности формирования семян сосныобыкновенной в отдалённый период после аварии на Чернобыльской АЭС / С.А. Гераськин, Д.В. Васильев, А.Г. Кузьменков // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55. – № 5. – С. 539–547.

23. Гераськин, С.А. Последствия хронического облучения сосны обыкновенной в отдалённый период после аварии на Чернобыльской АЭС / С.А. Гераськин, Н.С. Дикарева, А.А. Удалова и др. // Экология. – 2016. – № 1. – С. 30–43.

24. Глазун, И.Н. Динамика жизнеспособности пыльцы сосны обыкновенной в зоне отчуждения ЧАЭС / И.Н. Глазун // Известия высших учебных заведений «Лесной журнал». – 2006. – № 2. – С. 39–42.

25. Гольцова, Н.И. Влияние радиоактивного загрязнения на структурные особенности сосны обыкновенной *Pinus silvestris* L. (ЧАЭС) / Н.И. Гольцова // В кн.: Чернобыль-90. Доклады 1-ой междунар. конф. «Биологические и

радиоэкологические аспекты последствий аварии на Чернобыльской АЭС». Т. 1. – п. Зелёный Мыс, 1990. – С. 74–89.

26. Горшкова, Т.А. Изучение зависимости флуктуирующей асимметрии у растений от величины радиоактивного загрязнения территории / Т.А. Горшкова, Р.С. Чурюкин, О.А. Карагузова и др. // Известия вузов. Ядерная энергетика. – 2013. – № 1. – С. 116–124.

27. Горшкова, Т.А. Биоиндикация состояния природной среды в районе расположения Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами / Т.А. Горшкова, А.А. Удалова, С.А. Гераськин и др. // Известия вузов. Ядерная энергетика. – 2014. – № 4. – С. 130–139.

28. Гродзинский, Д.М. Радиобиология растений / Д.М. Гродзинский. – Киев: Наук. думка, 1989. – 384 с.

29. Гурина, Н.С. Ботанические аспекты изучения поллинозов: автореф. дис. ... д-ра. биолог. наук: 03.00.05. / Гурина Наталия Сергеевна. – М., 1994. – 36 с.

30. Демченко, С.И. Особенности мутационной и модификационной изменчивости, вызываемой химическими мутагенами у растений: автореф. дис. … д-ра биолог. наук: 03.00.15. / Демченко Светлана Исааковна. – М., 1984. – 46 с.

31. Дзюба, О.Ф. Палиноиндикация качества окружающей среды / О.Ф. Дзюба. – СПб.: Недра, 2006. – 197 с.

32. Дзюба, О.Ф. Тератоморфные пыльцевые зёрна в современных и палеопалинологических спектрах и некоторые проблемы палиностратиграфии / О.Ф. Дзюба // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2007. – № 2. – С. 561–581.

33. Драган, Г.И. Перспективы использования сосны обыкновенной как биоиндикатора на территории с низким уровнем радиоактивного загрязнения / Г.И. Драган, Н.В. Драган, Ф.М. Левон // Материалы Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2006 года: экологические проблемы XXI века». – Минск. – 2006. – С. 206–208.

34. Дубинин, Н.П. Эволюция и радиация / Н.П. Дубинин. – М.: Атомиздат, 1966. – 742 с.

35. Дьяконов, В.В. Состояние лесов охраняемых территорий Карелии в связи с атмосферным загрязнением / В.В. Дьяконов // Проблемы антропогенной трансформации лесных биогеоценозов Карелии: Сб. трудов. – Петрозаводск: КНЦ РАН, 1996. – С. 6–17.

36. Евсеева, Т.И. Оценка репродуктивной способности *Pinus sylvestris*, произрастающей в условиях хронического воздействия радионуклидов уранового и ториевого рядов / Т.И. Евсеева, С.А. Гераськин, Е.С. Белых и др. // Экология. – 2011. – № 5. – С. 355–360.

37. Еловичева, Я.К. Основы палинологии: учебное пособие / Я.К. Еловичева. – Минск: БГУ, 2016. – 334 с.

38. Ефимов, Ю.П. Семенные плантации в селекции и семеноводстве сосны обыкновенной / Ю.П. Ефимов. – Воронеж: Истоки, 2010. – 252 с.

39. Жаворонков, Л.П. Основы прикладной медико-биологической статистики / Л.П. Жаворонков. – Обнинск: ФГБУ МРНЦ Минздравсоцразвития России, 2012. – 60 с.

40. Животовский, Л.А. Популяционная биометрия / Л.А. Животовский. – М.: Наука, 1991. – 271 с.

41. Захаров, В.М. Асимметрия животных (популяционно-феногенетический подход) / В.М. Захаров. – М.: Наука, 1987. – 216 с.

42. Захаров, В.М. Здоровье среды: методика оценки / В.М. Захаров, А.С. Баранов, В.И. Борисов и др. – М.: Центр экологической политики России, 2000. – 68 с.

43. Захаров, В.М. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях / В.М. Захаров, Н.П. Жданова, Е.Ф. Кирик и др. // Онтогенез. – 2001. – Т. 32. – № 6. – С. 40–421.

44. Захарова, К.В. Роль экологических факторов в формировании генетической структуры популяций Р. *Abies* Karst. / К.В. Захарова, К.С. Сейц // Экологическая генетика. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 11–20.

45. Зяблицкая, Е.Я. Анализ генетических последствий загрязнения посевов озимой ржи радиоактивными выпадениями Чернобыльской АЭС / Е.Я. Зяблицкая,

С.А. Гераськин, А.А. Удалова, Е.В. Спирин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1996. – Т. 36. – Вып. 4. – С. 498–505.

46. Ибрагимова, Э.Э. Индикация загрязнения окружающей среды в урбанизированных экосистемах с использованием пыльцы *Pinus sylvestris* L. // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22 (61). – № 4. – С. 54–65.

47. Иванов, В.П. Использование индексов флуктуирующей асимметрии листа берёзы повислой для диагностики состояния фитоценозов в условиях техногенного загрязнения / В.П. Иванов, Ю.В. Иванов, С.И. Марченко, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 3. – С. 368–377.

48. Ипатьев, В.А. Лес и Чернобыль (Лесные экосистемы после аварии на Чернобыльской АЭС, 1986–1994 гг.) / В.А. Ипатьев, И.М. Булавик, В.Ф. Багинский; под ред. В.А. Ипатьева. — Минск: МНПП «Стенер», 1994. – 235 с.

49. Ипатьев, В.А. Лес. Человек. Чернобыль. Лесные экосистемы после аварии на Чернобыльской АЭС: состояние, прогноз, реакция населения, пути реабилитации / В.А. Ипатьев, В.Ф. Брагинский, И.М. Булавик и др. – Минск: Ин-т леса НАН Беларуси, 1999. – 451 с.

50. Казакова, Е.А. Анализ изменений генетической структуры хронически облучаемых популяций сосны обыкновенной / Е.А. Казакова, П.Ю. Волкова, С.А. Гераськин // Экологическая генетика. – 2017. – Т.15. – № 2. – С. 50–61.

51. Калашник, Н.А. Аномалии пыльцы хвойных видов деревьев при промышленном загрязнении на Южном Урале / Н.А. Калашник, С.М. Ясовиева, Л.П. Преснухина // Лесоведение. – 2008. – № 2. – С. 33–40.

52. Калашник, Н.А. Аномалии пыльцы лиственницы Сукачева в различных экологических условиях / Н.А. Калашник // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13. – № 1 (4). – С. 835–838.

53. Кальченко, В.А. Генетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих в условиях хронического облучения малыми дозами / В.А. Кальченко, Д.А. Спирин // Генетика. – 1989. – Т. 25. – № 6. – С. 1059–1064.

54. Кальченко, В.А. Генетические эффекты в популяции сосны обыкновенной, подвергшейся радиационному воздействию при аварии на Чернобыльской АЭС / В.А. Кальченко, И.С. Федотов, Н.П. Архипов / «Чернобыль-88»: Доклады I Всесоюз. науч.-техн. совещ. – Чернобыль, 1989. – Т. 3. – Ч. 2. – С. 74–88.

55. Кальченко, В.А. Хроническое облучение как экологический фактор, влияющий на генетическую структуру популяций / В.А. Кальченко, В.А. Калабушкин, А.В. Рубанович // Генетика. – 1991. – Т. 27. – № 4. – С. 676–684.

56. Кальченко, В.А. Генетические процессы в хронически облучаемых природных популяциях *Centaurea scabiosa* L., произрастающих на Восточно-Уральском радиоактивном следе / В.А. Кальченко, А.В. Рубанович, В.А. Шевченко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 37 – Вып. 5. – С. 708–719.

57. Кальченко, В.А. Генетический эффект в популяциях *Pinus sylvestris* L. из Восточно-Уральского радиоактивного следа, зоны контроля аварии на Чернобыльской АЭС и района испытаний ядерных устройств на Семипалатинском полигоне / В.А. Кальченко, В.А. Шевченко, А.В. Рубанович и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35. – № 5. – С. 702–707.

58. Кальченко, В.А. Генетические эффекты острого и хронического воздействия ионизирующих излучений на *Pinus sylvestris* L., произрастающих в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС / В.А. Кальченко, И.С. Федотов // Генетика. – 2001. – Т. 37. – № 4. – С. 437–447.

59. Кальченко, В.А. Цитогенетические эффекты в популяциях растений, произрастающих на Восточно-Уральском радиоактивном следе / В.А. Кальченко, В.И. Абрамов, А.В. Рубанович и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42. – № 6. – С. 745–749.

60. Карабань, Р.Т. Поражение древесного яруса леса при остром гамма-облучении в разные фенофазы / Р.Т. Карабань, Н.Н. Мишенков, Д.А. Спирин и др. // ДАН СССР. – 1980. – Т. 252. – № 3. – С. 776–778.

61. Картель, Н.А. Генетика. Энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с.

62. Козубов, Г.М. Биология плодоношения хвойных на Севере / Г.М. Козубов. – Л.: Наука, 1974. – 136 с.

63. Козубов, Г.М. Современные голосеменные (морфолого-систематический обзор и кариология) / Г.М. Козубов. – Л.: Наука, 1986. – 192 с.

64. Козубов, Г.М., Радиобиологические исследования сосновых лесов в районе аварии на Чернобыльской АЭС / Г.М. Козубов, А.И. Таскаев, Н.В. Ладанова и др. – Сыктывкар: Коми НЦ УрО АН СССР, 1987. – 52 с.

65. Козубов, Г.М. Радиационное воздействие на хвойные леса в районе аварии на Чернобыльской АЭС / под ред. Г.М. Козубова, А.И. Таскаева. – Сыктывкар: Коми научный центр УрО АН СССР, 1990. – 133 с.

66. Козубов, Г.М. Биометрические исследования вегетативных побегов сосны и ели при хроническом облучении / Г.М. Козубов, А.П. Патов, Е.А. Кузин // Труды Коми научного центра УрО РАН. – 1993. – С. 105–117.

67. Козубов, Г.М. Радиобиологические и радиоэкологические исследования древесных растений / Г.М. Козубов, А.И. Таскаев. – СПб.: Наука, 1994. – 255 с.

68. Козубов, Г.М. Радиобиологические исследования лесных древесных растений в районе аварии на Чернобыльской АЭС / Г.М. Козубов // Труды Коми научного центра УрО РАН. – 1996. – Т. 2. – № 145. – С. 4–18.

69. Козубов, Г.М. Радиобиологические исследования хвойных в районе Чернобыльской катастрофы / Г.М. Козубов, А.И. Таскаев. – М.: НПЦ «Дизайн. Информация. Картография», 2002. – 256 с.

70. Козубов, Г.М. Особенности морфогенеза и ростовых процессов у хвойных растений в районе аварии на ЧАЭС / Г.М. Козубов, А.И. Таскаев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47. – № 2. – С. 204–223.

71. Конарев, В.Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В.Г. Конарев, И.П. Гаврилюк, Н.К. Губарева и др.; под ред. В.Г Конарева. – СПб.: ВИР, 2000. – 186 с.

72. Конарев, А.В. Адаптивный характер молекулярного полиморфизма и его использование в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции / А.В. Конарев // Аграрная Россия. – 2002. – № 3. – С. 4–11.

73. Кордюм, Е.Л. Результаты цитогенетического мониторинга видов покрытосеменных растений, произрастающих в зоне радионуклеотидного загрязнения после аварии на Чернобылькой АЭС / Е.Л. Кордюм, П.Г. Сидоренко // Цитология и генетика. – 1997. – Т.31. – № 3. – С. 39–46.

74. Кравец, Е.А. Влияние УФ-Б облучения на репродуктивную функцию растений *Hordeum vulgare* L. / Е.А. Кравец, Д.М. Гродзинский, Н.И. Гуща // Цитология и генетика. – 2008. – № 5. – С. 9–15.

75. Криволуцкий, Д.А. Действие ионизирующей радиации на биогеоценоз / Д.А. Криволуцкий, Ф.А. Тихомиров, Е.А. Федоров и др. – М.: Наука, 1988. – 240 с.

76. Кряжева, Н.Г. Анализ стабильности развития берёзы повислой в условиях химического загрязнения / Н.Г. Кряжева, Е.К. Чистякова, В.М. Захаров // Экология. – 1996. – № 6. – С. 441–444.

77. Лайус, Д.Л. Флуктуирующая асимметрия и случайная фенотипическая изменчивость в популяционных исследованиях: история, достижения, проблемы, перспективы / Д.Л. Лайус, Д.Х. Грэм, М.В. Католикова, А.О. Юрцева // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3: Биология. – 2009. – Вып. 3. – С. 98–110.

78. Ларина, Н.П. Качество пыльцы сосны обыкновенной в окрестностях г. Тайшета / Н.П. Ларина, Н.Е. Носкова // Материалы международной заочной научной конференции «Проблемы современной аграрной науки». – Красноярск. – 2012. – С. 64–66.

79. Лутова, Л.А. Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Т.А. Ежова, И.Е. Додуева, М.А. Осипова. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. – 432 с.

80. Майсеенок, А.П. Лесовосстановление в техногенной среде / А.П. Майсеенок // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. научных трудов. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2001. – № 53. – С. 257–259.

81. Макаренко Е.С. Пыльца сосны обыкновенной, произрастающей на радиоактивно загрязнённых территориях / Е.С. Макаренко, А.А. Удалова // Современные проблемы радиобиологии и радиоэкологии: сборник докладов молодёжного круглого стола в рамках XLVI международных радиоэкологических чтений, посвящённых действительному члену ВАСХНИЛ В.М. Клечковскому. – 2017. – С. 80–84.

82. Махнева, С.Г. Состояние мужской генеративной системы сосны обыкновенной при техногенном загрязнении среды: дис. ... канд. биолог. наук: 03.00.16. / Махнева Светлана Георгиевна. – Екатеринбург, 2005. – 188 с.

83. Медведева, Л.М. Аномальная и многомешковая пыльца голосеменных из татарских отложений бассейна р. Северная Двина / Л.М. Медведева // Палинология и полезные ископаемые: Тез. докл. VI Всесоюз. палинол. конф. – Минск: БелНИГРИ, – 1989. – С. 192–193.

84. Мельникова, Т.А. Аномальная пыльца рода *Pinus L.* как индикатор палеоклиматических флюктуаций в позднем голоцене / Т.А. Мельникова // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2004. – № 3. – С. 178–182.

85. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур). Распоряжение МПР № 460-р от 16.10.2003. М., 2003. – 24 с.

86. Методы планирования и обработки результатов инженерного эксперимента: Конспект лекций (отдельные главы из учебника для вузов) / Н.А. Спирин, В.В. Лавров; под общ. ред. Н.А. Спирина. – Екатеринбург: ГОУ ВПО УГТУ-УПИ, 2004. – 257 с.

87. Минина, Е.Г. Геотропизм и пол у хвойных / Е.Г. Минина. – Новосибирск: Наука, 1983. – 197 с.

88. Михеев, А.Н. Гигантизм фотосинтезирующих органов лиственных и хвойных пород деревьев в условиях повышенного радиационного фона / А.Н.

Михеев, Л.Г. Овсянникова // Сб. трудов Международной научно-практической конференции «Радиоэкология-2015». – Киев. – 2015. – С. 102–106.

89. Молотковский Г.Х. Асимметрия, диссимметрия и полярность развития растений / Г.Х. Молотковский, Ю.Г. Молотковский // Ботанический журнал. – 1961. – Т. 46. – № 4. – С. 469–487.

90. Молчанова, И.В. Радиоактивные изотопы в системе почва-растение / И.В. Молчанова, Н.В. Куликов. – М.: Атомиздат, 1972. – 86 с.

91. Неверова, О.А. К вопросу об устойчивости сосны обыкновенной в условиях урбанизированной среды / О.А. Неверова, Н.И. Колмогорова // Материалы междунар. конф. «Антропогенное воздействие на лесные экосистемы». – Барнаул. – 2002. – С. 62–64.

92. Носкова, Н.Е. Особенности генеративных процессов у сибирских видов хвойных в связи с климатическими изменениями / Н.Е. Носкова, Л.И. Романова, И.Н. Третьякова // Вестник Томского государственного университета. – 2004. – № 10. – С. 78–81.

93. Носкова, Н.Е. Особенности формирования мужской генеративной сферы сосны обыкновенной в условиях техногенеза / Н.Е. Носкова, И.Н. Третьякова, Е.А. Носков // Хвойные бореальной зоны. – 2006. – Т. 23. – № 2. – С. 211–214.

94. Носкова, Н.Е. Влияние стресса на репродуктивные способности сосны обыкновенной / Н.Е. Носкова, И.Н. Третьякова // Хвойные бореальной зоны. – 2006. – Вып. 3. – № 1. – С. 54–63.

95. Носкова, Н.Е. Репродукция сосны обыкновенной в условиях глобального изменения климата и стратегические пути сохранения вида / Н.Е. Носкова, И.Н. Третьякова // Хвойные бореальные зоны. – 2011. – Вып. 28. – № 1. – С. 41–46.

96. Пастернак, П.С. Воздействие загрязнения атмосферы на сосновые леса Донбасса / П.С. Пастернак, В.П. Ворон, Т.Ф. Стельмахова // Лесоведение. – 1993. – № 2. – С. 28–38.

97. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос, 1988. – 304 с.

98. Поддубная-Арнольди, В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы / В.А. Поддубная-Арнольди. – М.: Наука, 1976. – 508 с.

99. Позолотина, В.Н. Современное состояние наземных экосистем Восточно-Уральского радиоактивного следа: уровни загрязнения, биологические эффекты / В.Н. Позолотина, И.В. Молчанова, Е.Н. Караваева и др. – Екатеринбург: Гощицкий, 2008. – 204 с.

100. Позолотина, В.Н. Эколого-генетическая характеристика звездчатки злаковой в условиях радиоактивного загрязнения / В.Н. Позолотина, Е.В. Антонова, Э.М. Каримуллина // Экология. – 2010. – № 6. – С. 459–468.

101. Пономарева, Р.П. Действие острого гамма-облучения на фотосинтетический аппарат берёзы и сосны / Р.П. Пономарева // Проблемы лесной радиоэкологии: Труды ИПГ. – М.: Гидрометиздат, 1979. – Вып. 38. – С. 68–75.

102. Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье среды / под ред. В.М. Захарова, Е.Ю. Крысанова. – М.: Центр экологической политики России, 1996. – 170 с.

103. Правдин, Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция / Л.Ф. Правдин. – М.: Наука, 1964. – 191 с.

104. Привалов, Г.Ф. Чувствительность семян некоторых видов древесных растений к ионизирующим лучам / Г.Ф. Привалов // Радиобиология. – 1963. – Т. 3. – Вып. 5. – С. 770–772.

105. Ребриков, Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; под ред. д.б.н. Д.В. Ребрикова; предисл. Л.А. Остермана и акад. РАН и РАСХН Е.Д. Свердлова; 2-е изд., испр. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

106. Романовский, М.Г. Формирование урожая семян сосны в норме и при мутагенном загрязнении / М.Г. Романовский. – М.: Наука, 1997. – 112 с.

107. Ромашкин, Д.Ю. Использование индекса флуктуирующей асимметрии для биоиндикационной оценки биологической устойчивости лесов в зонах радиоактивного загрязнения / Д.Ю. Ромашкин, И.В. Чубугина, А.И. Радин, А.Н. Раздайводин // Лесной вестник. – 2016. – Т. 20. – Вып. 5. – С. 122–128.

108. Рябинин, В.М. Влияние промышленных газов на рост деревьев и кустарников / В.М. Рябинин // Ботанический журнал. – 1962. – Т. 47. – Вып. 3. – С. 412–416.

109. Рязанцева, Л.А. Функциональные нарушения насаждений сосны обыкновенной под воздействием техногенных выбросов предприятий Воронежа / Л.А. Рязанцева, С.В. Басова, В.И. Спесивцева, А.И. Федченко // Лесоведение. – 1999. – № 2. – С. 22–27.

110. Сарапульцев, Б.И. Генетические основы радиорезистентности и эволюция / Б.И. Сарапульцев, С.А. Гераськин. – М.: Энергоатомиздат, 1993. – 208 с.

111. Свинцова, В.С. Характеристика признаков репродуктивной сферы *Pinus sylvestris* L. в условиях среднерусской лесостепи (Воронежская обл.): автореф. дис. ... канд. биолог. наук: 03.00.05. / Свинцова Валентина Сергеевна. – Воронеж, 2002. – 22 с.

112. Сергеева С.А. Изучение репарации радиационных повреждений у растений, произрастающих в условиях хронического бета-облучения / С.А. Сергеева, А.Б. Семов, В.И. Абрамов, В.А. Шевченко // Радиобиология. – 1985. – Т. 25. – № 6. – С. 774–777.

113. Скок, А.В. Влияние радиоактивного загрязнения сосны обыкновенной на жизнеспособность и аномалии пыльцы в Брянском округе зоны широколиственных лесов / А.В. Скок, И.Н. Глазун, Е.Н. Самошкин // Известия вузов. Лесной журнал. – 2005. – № 5. – С. 7–12.

114. Современные проблемы радиологии в сельскохозяйственном производстве / под общ. ред. Ю.А. Мажайского. – Рязань: Изд-во Мещерского филиала ВНИИГиМ Россельхозакадемии, 2010. – 363 с.

115. Спэрроу, А.Х. Чувствительность растений к хроническому γ-облучению / А.Х. Спэрроу, Л.А. Шейнер, Дж.М. Вудвелл // В кн.: Вопросы радиоэкологии. – М.: Атомиздат. – 1968. – С. 57–85.

116. Спиридонов, С.И. Оценка доз облучения древесных растений в отдалённый период после аварии на Чернобыльской АЭС / С.И. Спиридонов, С.В. Фесенко, С.А. Гераськин и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48. – № 4. – С. 432–438.

117. Спирин, Д.А. Радиационные и пострадиационные изменения в лесном биогеоценозе при остром гамма-облучении. Повреждение облучённого леса насекомыми-ксилофагами / Д.А. Спирин, В.Л. Усачев, Р.М. Алексахин и др. // Радиобиология. – 1985. – Т. 25. – Вып. 2. – С. 278–280.

118. Сулимова, Г.Е. ДНК-маркёры в генетических исследованиях: типы маркёров, их свойства и область применения / Г.Е. Сулимова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – № 3. – С. 260–271.

119. Сурсо, М.В. Влияние хронического облучения на мужскую репродуктивную сферу сосны обыкновенной / М.В. Сурсо // Труды Коми научного центра УрО РАН. – 1993. – № 127. – С. 133–143.

120. Теребова, Е.Н. Индивидуальная изменчивость метаболических показателей сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения / Е.Н. Теребова, Н.А. Галибина, Т.А. Сазонова, Т.Ю. Таланова // Лесоведение. – 2003. – № 1. – С. 73–77.

121. Тихомиров, Ф.А. Действие ионизирующих излучений на экологические системы / Ф.А. Тихомиров. – М.: Наука, 1972. – 176 с.

122. Тихомиров, Ф.А. Поступление ^{90}Sr и ^{137}Cs в древесную растительность из почвы. / Ф.А. Тихомиров, Р.Т. Карабань, М.А. Бочарова // Материалы Всесоюзного симпозиума «Теоретические и практические аспекты действия малых доз ионизирующей радиации». – Сыктывкар. – 1973. – 139 с.

123. Тихомиров, Ф.А. Накопление ^{90}Sr и ^{137}Cs в опытах с сеянцами хвойных древесных растений / Ф.А. Тихомиров, Р.Т. Карабань, М.А. Бочарова // Лесоведение. – 1975. – №1. – С. 82–87.

124. Токарев, П.И. Палинология древесных растений, произрастающих на территории России: автореф. дис. … д-ра. биолог. наук: 03.00.05 / Токарев Петр Иванович. – М., 2004. – 55 с.

125. Третьякова, И.Н. О способности пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) прорастать до пыления / И.Н. Третьякова // Известия Сибирского Отделения Академии Наук СССР. Серия Биология. – 1987. – Вып. 2. – № 4. – С. 11–17.

126. Третьякова, И.Н. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса / И.Н. Третьякова, Н.Е. Носкова // Экология. – 2004. – № 1. – С. 26–33.

127. Тужилкина, В.В. Влияние техногенного загрязнения на фотосинтетический аппарат сосны / В.В. Тужилкина, Н.В. Ладонова, С.Н. Плюснина // Экология. – 1998. – № 2. – С. 89–93.

128. Тупицын, С.С. Уровень тератогенеза как показатель состояния биообъекта в разных экологических условиях / С.С. Тупицын, Н.Е. Рябогина, Л.С. Тупицына // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 1 (3). – С. 822–828.

129. Удалова, А.А. Биологический контроль радиационно-химического воздействия на окружающую среду и экологическое нормирование ионизирующих излучений: дис. ... д-ра биолог. наук: 03.01.01, 03.02.08. / Удалова Алла Александровна. – Обнинск, 2011. – 434 с.

130. Федотов, И.С. Радиационно-генетические последствия облучения популяции сосны обыкновенной в зоне аварии на ЧАЭС / И.С. Федотов, В.А. Кальченко, Е.В. Игонина, А.В. Рубанович // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46. – № 3. – С. 268–278.

131. Хан, Л.В. Морфологические изменения хвои сосны обыкновенной в условиях городской среды / Л.В. Хан // Актуальные проблемы лесного комплекса: Сб. информ. материалов междунар. науч.-техн. конф. «Лес-2000». – Брянск: РИО БГИТА, 2000. – Вып. 1. – С. 91–92.

132. Хлебова, Л.П. Изменчивость признаков пыльцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях Барнаула / Л.П. Хлебова, О.В. Ерещенко // Известия Алтайского государственного университета. Серия Биологические науки. – 2013. – № 3 (79). – Т. 1. – С. 103–107.

133. Хромова, Л.В. Ритм развития пыльцы *Pinus sylvestris* L. в условиях Московской области / Л.В. Хромова // Лесоведение. – 1972. – № 1. – С. 73–76.

134. Цветнова, О.Б. Роль растительного покрова в регулировании потоков техногенных радионуклидов на различных этапах после радиоактивных выпадений / О.Б. Цветнова, А.И. Щеглов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – № 2. – С. 158–165.

135. Чепик, Ф.А. Биология развития и типы морфогенеза побегов древесных растений (на примере сосны обыкновенной) / Ф.А. Чепик. – Л.: Лесотехническая Академия, 1982. – 72 с.

136. Чережанова, Л.В. О биологическом действии повышенного фона ионизирующих излучений и процессах радиоадаптации в популяциях травянистых растений / Л.В. Чережанова, Р.М. Алексахин // Журнал общей биологии. – 1975. – Т. 36. – № 2. – С. 303–311.

137. Шадрина, Е.Г. Показатели нарушения стабильности развития растений и животных как критерий качества среды в зоне воздействия предприятий угледобывающей промышленности Якутии / Е.Г. Шадрина, Я.Л. Вольперт, В.А. Данилов // Проблемы региональной экологии. – 2009. – № 3. – С. 43–48.

138. Шевченко, В.В. Цитогенетические эффекты в природных популяциях *Crepis tectorum*, подвергающихся хроническому облучению в районе Чернобыльской АЭС. Индукция аберраций хромосом в течение первых 2 лет после аварии / В.В. Шевченко, Л.И. Гриних // Радиобиология. – 1990. – Т. 30. – № 6. – С. 728–734.

139. Шевченко, В.А. Радиационная генетика природных популяций / В.А. Шевченко, В.Л. Печкуренков, В.И. Абрамов. – М.: Наука, 1992. – 221 с.

140. Шевченко, В.А. Генетические исследования на Восточно–Уральском радиоактивном следе / В.А. Шевченко // В кн. Экологические последствия радиоактивного загрязнения на Южном Урале. – М.: Наука. – 1993. – С. 258–302.

141. Шевченко, В.А. Генетические последствия для популяций растений радиоактивного загрязнения окружающей среды в связи с Чернобыльской аварией / В.А. Шевченко, В.И. Абрамов, В.А. Кальченко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1996. – Т. 36. – Вып. 4. – С. 531–545.

142. Шевченко, В.А. Генетические эффекты в популяциях растений, произрастающих в зонах Кыштымской и Чернобыльской аварий / В.А. Шевченко, В.А. Кальченко, В.И. Абрамов и др. / Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39. – Вып. 1. – С. 162–169.

143. Шевченко, О. Морфологическая изменчивость листьев берёзы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях радиоактивного загрязнения среды / О. Шевченко // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. – 2005. – № 6. – С. 16-17.

144. Шкварников, П.К. Цитологическое исследование растений, произраставших под воздействием разных уровней радиации / П.К. Шкварников // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24. – № 5. – С. 33–37.

145. Шушкевич, Т.В. Основы метрологии. Часть II: учебное пособие / Т.В. Шушкевич. – Таганрог: Изд-во ТТИ ЮФУ, 2013. – 72 с.

146. Экологический мониторинг: Учебно-методическое пособие / под ред. Т.Я. Ашихминой. – М.: Академический проект, 2005. – 416 с.

147. Ahuja, M.R. Evolution of genome size in conifers / M.R. Ahuja, D.B. Neale // Silvae Genetica. – 2005. – V. 54. – P. 126–137.

148. Acher, V. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers / V. Acher, P. Faivre-Rampant, S. Jeandroz et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – V. 108. – P. 1602–1613.

149. Albarran-Lara, A.L. Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico / A.L. Albarran-Lara, L. Mendoza-

Cuenca, S. Valencia-Avalos et al. // International Journal of Plant Sciences. – 2010. – V. 171. – № 3. – P. 310−322.

150. Anne, P. Is fluctuating asymmetry a reliable biomonitor of stress? A test using life history parameters in soybean / P. Anne, F. Mawri, S. Gladstone, C.D. Freeman // International Journal of Plant Sciences. – 1998. – V. 159. – P. 559–565.

151. Arrigo, N. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, and R package for automating AFLP scoring / N. Arrigo, J.W. Tuszynski, D. Enrich et al. // BMC Bioinforma. – 2009. – V. 10. – 33.

152. Banks, S.C. How does ecological disturbance influence genetic diversity? / S.C. Banks, G.J. Cary, A.L. Smith et al. // Trends in Ecology and Evolution. – 2013. – V. 28. – P. 670–679.

153. Beasley, D.E. Effects of parental radiation exposure on developmental instability in grasshoppers / D.E. Beasley, A. Bonisoli-Alquati, S.M. Welch et al. // Journal of Evolutionary Biology. – 2012. – V. 25. – P. 1149–1162.

154. Bickham, J. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology / J. Bickham, M. Smolen // Environmental Health Perspectives. – 1994. – V. 102. – P. 25–28.

155. Bickham, J. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology / J. Bickham, S. Sandhu, P. Hebert et al. // Mutation Research. – 2000. – V. 463. – P. 33–51.

156. Bonin, A. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists / A. Bonin, D. Enrich, S. Manel // Molecular Ecology. – 2007. – V. 16. – P. 3737–3758.

157. Boratynska, K. Occurrence of three-needle dwarf shoots on European species of the genus *Pinus* (*Pinaceae*) / K. Boratynska, A. Boratynski // Plant Biosystems. – 2006. – V. 140. – №. 1. – P. 21–26.

158. Botstein, D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein, R.L. White, M. Skolnik, R.W. Davis // American Journal of Human Genetics. – 1980. – V. 32. – P. 314–331.

159. Brock, R.D. Quantitatively inherited variation in *Arabidopsis thaliana* induced by chemical mutagens / R.D. Brock // Environmental and Experimental Botany. – 1976. – V. 16. – P. 241–253.

160. Cato, S.A. Evaluation of AFLP for genetic mapping in *Pinus radiata* D. Don / S.A. Cato, G.E. Corbett, T.E. Richardson // Molecular breeding. – 1999. – V. 5. – № 3. – P. 275–281.

161. Chen, M.M. Genetic linkage maps of *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. based on AFLP markers / M.M. Chen, F.G. Feng, X. Sui, S.G. Han // African Journal of Biotechnology. – 2010. – V. 9. – № 35. – P. 5659–5664.

162. Cobb, N.S. Genetic-variation associated with chronic water and nutrient stress in pinyon pine / N.S. Cobb, J.B. Mitton, T.G. Whitham // American Journal of Botany. – 1994. – V. 81. – P. 936–940.

163. Conger, A.D. Relation of nuclear volume and radiosensitivity to ploidy level (haploid to 22-ploid) in higherplants and a yeast / A.D. Conger, A.H. Sparrow, S.S. Schwemmer, E.E. Klug // Environmental and Experimental Botany. – 1982. – V. 22. – P. 57–74.

164. Conord, C. Genetic structure of the forest pest *Hylobius abietis* on conifer plantations at different spatial scales in Europe / C. Conord, G. Lempérière, P. Taberlet, L. Després // Heredity. – 2006. – V. 97. – P. 46–55.

165. Duarte, G.T. / G.T. Duarte, P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin, неопубликованные данные.

166. Dzyuba, O.F. Pollen Angyosperms Teratomorphs as the Result of an Ecological Stress under Conditions of a Large City / O.F. Dzyuba // XV Ind. Botanical Congress, Abstr. Yokohama, Japan. 1993. – P. 247–287.

167. Eckert, A.J. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / A.J. Eckert, B. Pande, E.S. Ersoz et al. // Tree Genetics and Genomes. – 2009. – V. 5. – № 1. – P. 225–234.

168. Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution / H. Ellegren // Nature Reviews Genetics. – 2004. – V. 5. – P. 435–445.

169. Environmental risk from ionizing contaminants: assessment and management. Developed under EU 6th Framework Program. Contract No // ERICA. FI6R-CT-2004-508847. www.erica-project.org. 2003. 22.01.2015.

170. Foulley, J.L. Genetic diversity analysis using lowly polymorphic dominant markers: the example of AFLP in pigs / J.L. Foulley, van Schriek M.G.M., Alderson L. et al. // Journal of Heredity. – 2006. – V. 97. – P. 244–252.

171. Freeman, D.C. Developmental stability in plants − symmetries, stress and epigenesis / D.C. Freeman, J.H. Graham, J.M. Emlen // Genetica. – 1993. – V. 89. – № 1−3. – P. 97−119.

172. Geras'kin, S.A., Evseeva T.I., Oudalova A.A. Plants as a tool for the environmental health assessment / In: Encyclopedia of Environmental Health. Burlington: Elsevier, 2011. – V. 4. – P. 571–579.

173. Geras'kin, S.A. Cytogenetic damage and reproductive effects in Scots pine populations affected by the Chernobyl accident / S.A. Geras'kin, A.A. Oudalova, N.S. Dikareva et al. // Ecotoxicology. – 2011. – V. 20. – P. 1195–1208.

174. Geras'kin, S. Effects of long-term chronic exposure to radionuclides in plant populations / S. Geras'kin, T. Evseeva, A. Oudalova // Journal of Environmental Radioactivity. – 2013. – V. 121. – P. 22–32.

175. Geras'kin, S.A. Genetic diversity in Scots pine populations along a radiation exposure gradient / S.A. Geras'kin, P.Yu. Volkova // Science of the Total Environment. – 2014. – V. 496. – P. 317–327.

176. Geras'kin, S. Influence of long-term chronic exposure and weather conditions on Scots pine populations / S. Geras'kin, D. Vasiliyev, E. Makarenko et al. // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – V. 24. – № 12. – P. 11240–11253.

177. Graham, J.H. Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications / J.H. Graham, S. Raz, H. Hel-Or, E. Nevo // Symmetry. – 2010. – V. 2. – № 2. – P. 466−540.

178. Houston, D.E. Effect of ambient air pollution on cone, seed and pollen characteristics in eastern white and red pines / D.E. Houston, L.S. Dochinger // Environmental Pollution. – 1977. – V. 12. – № 1. – P. 1–5.

179. ICRP. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP Publication 103 // Ann. ICRP. – 2007. – V. 37. – № 2–4.

180. ICRP. Environmental protection: the concept and use of Reference Animals and Plants. ICRP Publication 108 // Ann. ICRP. – 2008. – V. 38. – № 4–6.

181. IAEA. Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: twenty years of experience / Report of the Chernobyl Forum Expert Group "Environment". – Vienna: International Atomic Energy Agency, 2006. – 166 pp.

182. Jermstad, K.D. Comparative mapping in *Pinus*: sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) and loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / K.D. Jermstad, A.J. Eckert, J.L. Wegrzyn et al. // Tree Genet Genomes. – 2011. – V. 7. – P. 457–468.

183. Junttila, O. Shoot and needle growth in Pinus sylvestris as related to temperature in Northern Fennoscandia / O. Junttila, O.M. Heide // Forest Science. – 1981. – V. 27. – P. 423–430.

184. Kan, Y.W. Polymorphism of DNA sequence adjacent to the β-globin structural gene. Its relation to the sickle mutation / Y.W. Kan, A.M. Dozy // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 1978. – V. 75. – P. 5631–5635.

185. Karhu, A. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? / A. Karhu, P. Hurme, M. Karjalainen et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 1996. – V. 93. – P. 215–221.

186. Kashparova, E.A. Dose rate causes no fluctuating asymmetry indexes changes in silver birch (*Betula pendula* (L.) Roth.) leaves and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles in the Chernobyl Exclusion Zone / E. Kashparova, S. Levchuk, V. Morozova, V. Kashparov // Journal of Environmental Radioactivity. – 2018. – in press.

187. Kim, P. The plasticity of human maternal brain: Longitudinal changes in brain anatomy during the early postpartum period / P. Kim, J.F. Leckman, L.C. Mayes et al. // Behavioral Neuroscience. – 2010. – V. 124. – P. 695–700.

188. Kis-Papo, T. Evolution of genomic diversity and sex at extreme environments: fungal life under hypersaline Dead Sea stress / T. Kis-Papo, V. Kirzhner, S.P. Wasser, E. Nevo // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 2003. – V. 100. – P. 14970–14975.

189. Kleppe, K. Studies on polynucleutides. XCVI Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed DNA polymerase / K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe et al. // Journal of Molecular Biology. – 1971. – V. 56. – P. 341–361.

190. Kolliker, R. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* / R. Kolliker, R. Kraehenbuehl, B. Boller, F. Widmer // Systematic and Applied Microbiology. – 2006 – V. 29. – P. 109–119.

191. Kovalchuk, I. Transgenic plants are sensitive bioindicators of nuclear pollution caused by the Chernobyl accident / I. Kovalchuk, O. Kovalchuk, A. Arkhipov, B. Hohn // Nature Biotechnology. – 1998. – V. 16. – P. 1054–1059.

192. Kovalchuk, O. Wheat mutation rate after Chernobyl / O. Kovalchuk, Y. Dubrova, A. Arkhipov et al. // Nature. – 2000. – V. 407. – P. 583–584.

193. Kovalchuk, O. Genome hypermethylation in *Pinus sylvestris* of Chernobyl – a mechanism for radiation adaptation? / O. Kovalchuk, P. Burke, A. Arkhipov et al. // Mutation Research. – 2003. – V. 529. – P. 13–20.

194. Kovalchuk, I. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone / I. Kovalchuk, V. Abramov, I. Pogribny, O. Kovalchuk // Plant Physiology. – 2004. – V. 135. – P. 357–363.

195. Kozlov, M.V. Difference in needle length – a new and objective indicator of pollution impact on Scots pine (*Pinus sylvestris*) / M.V. Kozlov, P. Niemela // Water, Air and Soil Pollution. – 1999. – V. 116. – P. 365–370.

196. Kozlov, M.V. Effects of compensatory fertilization on pollution-induced stress in Scots pine / M.V. Kozlov, P. Niemela, E. Malkonen // Water, Air, and Soil Pollution. – 2002. – V. 134. – P. 307–318.

197. Kozlov, M.V. Needle fluctuating asymmetry is a sensitive indicator of pollution impact on Scots pine (*Pinus sylvestris*) / M.V. Kozlov, P. Niemela, J. Junttila // Ecological Indicators. – 2002. – V. 1. – P. 271–277.

198. Kozlov, M.V. Drought is more stressful for Northern populations of Scots pine than low summer temperatures / M.V. Kozlov, P. Niemela // Silva Fennica. – 2003. – V. 37. – № 2. – P. 175–180.

199. Kozlov, M.V. Impacts of point polluters on terrestrial biota: comparative analysis of 18 contaminated areas / M.V. Kozlov, E.L. Zvereva, V. Zverev. – Dordrecht: Springer, 2009. – 466 p.

200. Kuchma, O. Evidence for selection in response to radiation exposure: *Pinus sylvestris* in the Chernobyl exclusion zone / O. Kuchma, R. Finkeldey // Environmental Pollution. – 2011. – V. 159. – P. 1606–1612.

201. Kuchma, O. Mutation rates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers / O. Kuchma, B. Vornam, R. Finkeldey // Mutation Research. – 2011. – V. 725. – P. 29–35.

202. Leary, R.F. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology / R.F. Leary, F.W. Allendorf // Trends in Ecology and Evolution. – 1989. – V. 4. – P. 214–217.

203. Lepoittevin, C. Association mapping for growth, straightness and wood chemistry traits in the *Pinus pinaster* Aquitaine breeding population / C. Lepoittevin, L. Harvengt, C. Plomion, P. Garnier- Géré // Tree Genetics and Genomes. – 2012. – V. 8. – P. 113–126.

204. Lerceteau, E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. / E. Lerceteau, A.E. Szmidt // Heredity. – 1999. – V. 82. – № 3. – P. 252–260.

205. Lerceteau E. AFLP mapping and detection of quantitative trait loci (QTLs) for economically important traits in *Pinus sylvestris*: a preliminary study / E. Lerceteau, Ch. Plomion, B. Andersson // Molecular Breeding. – 2000. – V. 6. – № 5. – P. 451–458.

206. Li, Z. Functional Multi-Locus QTL Mapping of Temporal Trends in Scots Pine Wood Traits / Z. Li, H.R. Hallingbäck, S. Abrahamsson et al. // G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2014. – V. 4. – № 12. – P. 2365–2379.

207. Makarenko, E.S. Study of needles morphometric indexes in Scots pine in the remote period after the Chernobyl accident / E.S. Makarenko, A.A.Oudalova, S.A. Geras'kin // Radioprotection. – 2016. – V. 51. – №. 1. – P.19–23.

208. Makarenko E.S. Morphometric indices of Scots pine needle under chronic radiation exposure / E.S. Makarenko, A.A. Oudalova, S.A. Geras'kin // Contemporary Problems of Ecology. – 2017. – V. 10. – №. 7. – P. 761–769.

209. Makarenko, E.S. Morphometric measurements of Scots pine needles from radioactively contaminated area / E.S. Makarenko, A.A. Oudalova, S.A. Geras'kin // XIII International youth scientific and practical conference "Future of atomic energy – AtomFuture 2017", KnE Engineering. – 2017. – P. 8–13.

210. Mba, C. Use of AFLP markers in surveys of plant diversity / C. Mba, J. Tohme // Methods in Enzymology. – 2005. – V. 395. – P. 177–201.

211. McMillan, A.M. Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor / A.M. McMillan, M.J. Bagley, S.A. Jackson, D.E. Nacci // Ecotoxicology. – 2006. – V. 15. – P. 539–548.

212. Mendelson, T.C. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity / T.C. Mendelson, K.L. Shaw // Methods in Enzymology. – 2005. – V. 395. – P. 161–177.

213. Mengoni, A. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of Silene paradoxa L. (Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis / A. Mengoni, C. Connelli, F. Galardi et al. // Molecular Ecology. – 2000. – V. 9. – P. 1319–1324.

214. Micieta, K. Microspore analysis for genotoxicity of a polluted environment / K. Micieta, G. Murin // Environmental and Experimental Botany. – 1996. – V. 36. – № 1. – P. 21–27.

215. Micieta, K. The use of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus nigra* Arnold as bioindicator species for environmental pollution / K. Micieta, G. Murin // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species: contributions by members of the IUFRO

Cytogenetics Working Party / Eds Borzan Z., Schlarbaum S.E. Zagreb: Hrvatske sume, 1997. – P. 253–264.

216. Mitton, J.B. Genetic variation in pinin pine, *Pinus edulis* associated with summer precipitation / J.B. Mitton, K.L. Duran // Molecular Ecology. – 2004. – V. 13. – P. 1259–1264.

217. Möller, A.P. Asymmetry, Developmental Stability and Evolution / A.P. Möller, J.P. Swaddle. – Oxford: Oxford University Press, 1997. – 162 p.

218. Møller, A.P. Developmental instability of plants and radiation from Chernobyl / A.P. Møller // Oikos. – 1998. – V. 81. – № 3. – P. 444–448.

219. Moraga-Suazo, P. Development of a genetic linkage map for *Pinus radiata* and detection of pitch canker disease resistance associated QTLs / P. Moraga-Suazo, L. Orellana, P. Quiroga et al. // Trees. – 2014. – V. 28. – P. 1823–1835.

220. Mulcahy, D.L. Pollen tetrads in the detection of environmental mutagenesis / D.L. Mulcahy // Environmental Health Perspectives. – 1981. – V. 37. – P. 19–25.

221. Neale, D.B. Use of DNA makers in forest tree improvement research / D.B. Neale, M.E. Devey, K.D. Jermstad et al. // New Forests. – 1992. – V. 6. – P. 391–407.

222. Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals / M. Nei // Genetics. – 1978. – V. 89. – P. 583–590.

223. Nova - собственная работа, CC BY 2.5, [Электронный ресурс] https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1675940

224. Nunes, V.L. Challenges and pitfalls in the characterization of anonymous outlier AFLP markers in non-model species: lessons from an ocellated lizard genome scan / V.L. Nunes, M.A. Beaumont, R.K. Butlin, O.S. Paulo // Heredity. – 2012. – V. 109. – P. 340–348.

225. Nybom, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants / H. Nybom // Molecular Ecology. – 2004. – V. 13. – P. 1143–1155.

226. Oleksyk, T.K. High levels of fluctuating asymmetry in populations of Apodemusflavicollis from themost contaminated areas in Chornobyl / T.K. Oleksyk,

J.M. Novak, J.R. Purdue et al. // Journal of Environmental Radioactivity. – 2004. – V. 73. – P. 1–20.

227. Palmer, A.R. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns / A.R. Palmer, C. Strobeck // Annual Review of Ecology and Systematics. – 1986. – V. 17. – P. 391–421.

228. Prus-Glowacki, W. Industrial pollutants tend to increase genetic diversity: evidence from field-grown European Scots pine populations / W. Prus-Glowacki, A. Wojnicka-Poltorak, J. Oleksyn, P.B. Reich // Water Air and Soil Pollution. – 1999. – V. 116. – P. 95–402.

229. Remington, D.L. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda* / D.L. Remington, R.W. Whetten, B. Liu, D.M. O'Malley // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – V. 98. – № 8. – P. 1279–1292.

230. Renganayaki, K. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers / K. Renganayaki, J.C. Read, A.K. Fritz // Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – V. 102. – P. 1037–1045.

231. Rittera, E. Towards construction of an ultra high density linkage map for *Pinus pinaster* / E. Rittera, A. Aragonésa, T. Markussenb et al. // Annals of Forest Science. – 2002. – V. 59. – P. 637–643.

232. SanCristobal, M. Genetic diversity in European pigs utilizing amplified fragment length polymorphism markers / M. SanCristobal, C. Chevalet, J. Peleman et al. // Animal Genetics. – 2006. – V. 37. – P. 232–238.

233. Shepherd, M. Genetic maps for *Pinus elliottii* var. *elliottii* and *P. caribaea var. hondurensis* using AFLP and microsatellite markers / M. Shepherd, M. Cross, M.J. Dieters, R. Henry // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – V. 106. – № 8. – P. 1409–1419.

234. Slomka, A. Increased genetic diversity of Viola tricolor L. in metal-polluted environments / A. Slomka, A. Sutkowska, M. Szczepaniak et al. // Chemosphere. – 2011. – V. 83. – P. 435–442.

235. Snyder, M.P. A transposable element that splits the promoter region inactivates a Drosophila cuticle protein gene / M.P. Snyder, D. Kimbrell, M. Hunkapiller et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. – 1982. – V. 79. – P. 7430–7434.

236. Soleimani, V.D. Identification of Canadian durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf) Husn.) cultivars using AFLP and their STS markers / V.D. Soleimani, B.R. Baum, D.A. Johnson // Canadian Journal of Plant Science. – 2002. – V. 82. – P. 35–41.

237. Soltis, D.E. Isozymes in Plant Biology / D.E. Soltis, P.S. Soltis (Eds.) – Netherlands: Springer, 1989. – 268 pp.

238. Sparrow, A.H. Prediction of the sensitivity of plants to chronic gamma irradiation / A.H. Sparrow, G.M. Woodwell // Radiation Botany. – 1962. – V. 2. – P. 9–26.

239. Spirin, D.A. Effects of ionizing radiation on organisms of terrestrial ecosystems in the East Urals radioactive track territory / D.A. Spirin; F.F. Luykx, M.J. Frissel (Eds.) // Radioecology and the Restoration of Radioactive-Contaminated Sites. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. – 1996. – P. 235–244.

240. Syomov, A.B. Analysis of DNA strand break induction and repair in plants from the vicinity of Chernobyl / A.B. Syomov, S.N. Ptitsyna, S.A. Sergeeva // Science of the Total Environment. – 1992. – V. 112. – P. 1–8.

241. Theodorakis, C.W. Genetic ecotoxicology I: DNA integrity and reproduction in mosquitofish exposed in situ to radionuclides / C.W. Theodorakis, B.G. Blaylock, L. Shugart // Ecotoxicology. – 1997. – V. 6. – P. 205–218.

242. Thoday, J.M. Homeostasis in a selection experiment / J.M. Thoday // Heredity. – 1955. – V. 12. – P. 401–415.

243. Valkama, J. Impact of climatic factors on the developmental stability of mountain birch growing in a contaminated area / J. Valkama, M.V. Kozlov // Journal of Applied Ecology. – 2001. – V. 38. – P. 665–673.

244. Van Dongen, K. Supporting Decision Making by a Critical Thinking Tool / Van K. Dongen, J. M. Schraagen, A. Eikelboom, G. Brake // In Proceedings of the 49th

Annual Meeting of the Human Factors and Ergonomics Society. – Santa Monica. – 2005. – P. 517–521.

245. Van Valen, L. A study of fluctuating asymmetry / L. Van Valen // Evolution. – 1962. – V. 16. – № 2. – P. 125–142.

246. Vekemans, X. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size / X. Vekemans, T. Beauwens, M. Lemaire, I. Roldan-Ruiz // Molecular Ecology. – 2002. – V. 11. – P. 139–151.

247. Volkova, P.Yu. Radiation exposure in the remote period after the Chernobyl accident caused oxidative stress and genetic effects in Scots pine populations / P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin, E.A. Kazakova // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – P. 43009.

248. Volkova, P.Yu. Chronic radiation exposure as an ecological factor: hypermethylation and genetic differentiation in irradiated Scots pine populations / P.Yu. Volkova, S.A. Geras'kin, N. Horemans et al. // Environmental Pollution. – 2018. – V. 232. – P. 105–112.

249. Vos, P. AFLP: new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hagers, M. Bleeker et al. // Nucleic Acids Research. – 1995. – V. 23. – P. 4407–4414.

250. Wallace, R.B. DNA Recombinant Technology / R.B. Wallace. – Boca Raton: CRC press, 1983. – 212 p.

251. Wang, Z.S. Reconciling actual and inferred population histories in the house finch (*Carpodacus mexicanus*) by AFLP analysis / Z.S. Wang, A.J. Baker, G.E. Hill, S.V. Edwards // Evolution. – 2003. – V. 57. – P. 2852–2864.

252. Watanabe, Y. Morphological defects in native Japanese fir trees around the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant / Y. Watanabe, S. Ichikawa, M. Kubota et al. // Scientific Reports. – 2015. – V. 5 – P. 13232.

253. Wilsey, B.J. Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and elevation in tree-line birches / B.J. Wilsey, E. Haukioja, J. Koricheva, M. Sulkinoja // Ecology. – 1998. – V. 79. – № 6. – P. 2092–2099.

254. Yang, H.X. Constructing genetic linkage maps for *Pinus elliottii* var. *elliottii* and *Pinus caribaea* var. *hondurensis* using SRAP, SSR, EST and ISSR markers / H.X. Yang, R. Luo, F.C. Zhao et al. // Trees. – 2013. – V. 27. – P. 1429–1442.

255. Yavnyuk, A.A. Fluctuating asymmetry of zebra mussel (*Dreissenapolymorpha Pall.*) and floating pondweed (*Potamogetonnatans L.*) in water bodies within the Chernobyl accident Exclusion Zone / A.A. Yavnyuk, N.N. Efremova, O.N. Protsenko et al. // Radioprotection. – 2009. – V. 44. – № 05. – P. 475–479.

256. Yin, T.M. Nearly complete genetic maps of *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) constructed by AFLP marker analysis in a full-sib family / T.M. Yin, X.R. Wang, B. Andersson, E. Lerceteau-Köhler // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – V. 106. – № 6. – P. 1075–1083.

257. Yoschenko, V.I. Morphological abnormalities in Japanese red pine (*Pinus densiflora*) at the territories contaminated as a result of the accident at Fukushima Dai-Ichi Nuclear Power Plant / V.I. Yoschenko, K. Nanba, S. Yoshida et al. // Journal of Environmental Radioactivity. – 2016. – V. 165. – P. 60–67.

258. Zavitkovski, J. Effects of gamma radiation on biomass production of ground vegetation under broadleaved forests of Northern Wisconsin / J. Zavitkovski, B.J. Salmonson // Radiation Botany. – 1975. – V. 15. – № 4. – P. 337–348.

259. Zelena, L. Indications of limited altered gene expression in *Pinus sylvestris* trees from the Chernobyl region / L. Zelena, B. Sorochinsky, von S. Arnold et al. // Journal of Environmental Radioactivity. – 2005. – V. 84. – P. 363–373.

260. Zhivotovsky, L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers / L.A. Zhivotovsky // Molecular Ecology. – 1999. – V. 8. – P. 907–913.