

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУ «Всероссийский научно-  
исследовательский институт лесоводства и  
механизации лесного хозяйства»

д-р с.-х. наук

А.А. Мартынюк

«17» декабря 2018 г.



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Макаренко Екатерины Сергеевны** на тему  
«Исследование морфологических параметров и генетического полиморфизма  
в природных популяциях сосны обыкновенной в условиях хронического  
радиационного воздействия», представленной на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – «Радиобиология»

**Актуальность исследования.** Диссертация Макаренко Екатерины Сергеевны посвящена актуальной проблеме современной радиобиологии – изучению последствий радиационных аварий для природных экосистем. Объектом исследования являются популяции сосны обыкновенной, расположенные в наиболее пострадавших от чернобыльской аварии районах России и Беларуси: Юго-Запада Брянской области и Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике в Гомельской области. Данный вид является одним из основных лесообразующих как в России, так и Белоруссии, занимая первое место по заготавливаемой древесине, в том числе в районах исследований. Кроме того, сосна используется в качестве референтного вида для оценки радиационного воздействия на биоту. Радиоактивное загрязнение изменило привычный характер ведения лесного хозяйства, наложило существенные ограничения на различные виды использования лесов и проведения в них лесохозяйственных мероприятий. Это привело к накоплению большого количества отмершей древесной растительности, в том числе лесных горючих материалов, вызвало изменение фитосанитарного состояния в лесах. Имеющиеся материалы лесопатологических обследований демонстрируют процессы комплексного изменения лесных экосистем в связи с радиоактивным загрязнением. Устойчивость популяций древесных растений в условиях хронического облучения, изучение генетических процессов, происходящих в этих популяциях, оценка их репродуктивного потенциала и нарушений развития

являются актуальными вопросами радиобиологии. Диссертационная работа Е.С. Макаренко затрагивает все эти вопросы и, несомненно, актуальна. Тема диссертации соответствует паспорту 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 в малых дозах на популяции сосны обыкновенной. Цели и задачи четко сформулированы, работа выполнена в рамках выбранной темы.

**Научная новизна.** Научная новизна работы заключается в том, что впервые для загрязненных территорий в отдалённый период после Чернобыльской аварии в параллельно выполненных исследованиях изучены морфологические показатели вегетирующих и репродуктивных органов и генетический полиморфизм в популяциях сосны обыкновенной. Показано отсутствие устойчивого значимого эффекта радиационного воздействия в диапазоне годовых доз облучения крон 10–130 мГр на морфометрические (длина и масса) показатели хвои. В то же время индекс флуктуирующей асимметрии, оценённый по длине парных хвоинок, 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 locus по Нею повышено на радиоактивно загрязнённых участках, а генетическая дифференциация популяций внутри географических групп согласуется с уровнем поглощённой дозы в кронах сосны.

**Теоретическое и практическое значение.** Диссертация Макаренко Екатерины Сергеевны представляет собой фундаментальное исследование и вносит вклад в изучение закономерностей адаптационных процессов, происходящих в лесных экосистемах в условиях хронического облучения. Леса являются экологическим каркасом территорий, пострадавших от чернобыльской аварии. Понимание биологических последствий для популяций лесообразующих видов, связанных с радиационным воздействием малых доз облучения в отдалённый период после аварии, необходимо в качестве основы для формирования долгосрочной стратегии возвращения пострадавших территорий к условиям нормальной жизнедеятельности,

разработке практических действий, способствующих сохранению и поддержанию биологической устойчивости лесных экосистем. Кроме того, полученные данные могут быть использованы для совершенствования существующей системы контроля состояния окружающей среды. Дополнение системы экологического мониторинга методами биоиндикации с использованием высших растений способно повысить надёжность и обоснованность оценок экологического риска.

**Личный вклад соискателя.** Автор работы принимала непосредственное участие в постановке цели и задач исследований, планировании и проведении полевых, включая экспедиции на радиоактивно загрязнённые территории, и камеральных (лабораторных) работ, выполнила самостоятельно статистическую обработку полученных данных, проанализировала большой объём литературы, принимала активное участие в интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций. По теме диссертации опубликовано 27 научных работ, в том числе 4 в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Содержание диссертации соответствует содержанию и качеству опубликованных работ. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, включает необходимые таблицы и рисунки. Результаты исследований были получены при выполнении проектов, поддержанных РФФИ (№ 11-04-00670; № 12-04-97550), РНФ (№ 14-14-00666) и апробированы автором на российских и международных конференциях.

**Оценка содержания диссертации.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 260 литературных источников, из которых 114 на иностранном языке. Диссертация изложена на 135 страницах, содержит 19 таблиц и 15 рисунков. Структура диссертации внутренне едина, подчинена задаче наиболее полного изложения материала.

Во **Введении** автором обосновывается актуальность темы, обсуждается степень разработанности проблемы, ставятся цель и задачи исследования, описывается его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология, изложены положения, выносимые на защиту. Также во введении изложены сведения о соответствии диссертации паспорту научной специальности, об апробации работы, личном вкладе диссертанта в работу. Кроме того, приводится информация о публикациях автора по теме диссертации, структуре и объёме диссертационной работы.

В **первой главе** автором на основе анализа отечественной и зарубежной литературы освещаются вопросы изучения воздействия хронического облучения на растения, в том числе сосну обыкновенную, как объект

радиобиологических исследований. Обсуждаются нарушения вегетативных и генеративных органов хвойных растений индуцированных радиационным воздействием, его влияние на формирование генетических нарушений в популяциях сосны обыкновенной. Большое внимание в обзоре литературы автором уделено состоянию хвои сосны обыкновенной, как биоиндикационному показателю и флуктуирующей асимметрии в условиях техногенного воздействия. Подробно изложены вопросы изучения пыльцы в качестве тест-объекта биоиндикации, влияние физических и химических факторов, обусловленных деятельностью промышленности на качество пыльцы, указывается, что влияние радиационного воздействия в условиях хронического облучения малыми дозами практически не изучено. Отдельный раздел посвящен оценке генетического полиморфизма ДНК в популяционно-генетических исследованиях. В нем приведен обзор литературы по анализу генетического разнообразия, методам выявления полиморфизма ДНК, в частности, анализу полиморфизма ДНК методом AFLP.

Во второй главе автором описаны объекты и методы исследования. Дана радиоэкологическая обстановка на экспериментальных участках, методы отбора проб почвы и определения в них удельной активности  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{40}\text{K}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  и  $^{232}\text{Th}$ . Изложены методы определения удельной активности  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  в пробах растительности и расчета дозовых нагрузок в кронах исследуемых деревьев сосны, оценки морфометрических показателей хвои, определения тератоморфных форм пыльцы. Детально изложен AFLP-анализ, включая выделение ДНК, приготовление первичной матрицы ДНК, рестрикцию геномной ДНК, лигирование адаптеров, преамплификацию, амплификацию с селективными праймерами и анализ данных. Используемые в работе методы являются общепринятыми, применение их в настоящем исследовании вполне обосновано, методы описаны подробно и вполне достаточны для получения необходимых для анализа данных.

Третья глава содержит 3 раздела, в которых изложены результаты работы и обсуждения в соответствии с поставленными задачами исследования.

В 1-м разделе дается оценка состояния хвои сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия. Оценка дается по массе и длине хвои, индексу флуктуирующей асимметрии, некротическим поражениям, нарушениям морфогенеза хвои. Выявлена статистически значимая корреляция длины хвои сосны с поглощённой дозой от  $\beta$ -излучения ( $r=-0.68$ ,  $p=0.043$ ) и удельной активностью  $^{90}\text{Sr}$  в шишках ( $r=-0.70$ ,  $p=0.036$ ). Показано, что хвоя сосны на загрязненных лесных участках является более короткой и более тяжёлой. Автор делает предположение, что формирование

утолщённой и укороченной хвои может быть обусловлено уменьшением синтеза ауксинов, но данное предположение требует дальнейшего изучения. Результаты исследования индекса флуктуирующей асимметрии по длине хвои сосны демонстрируют значимое превышение контрольных уровней ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ) и значимую связь с показателями радиационной нагрузки. Также автором рассчитаны индексы флуктуирующей асимметрии по массе хвои. Для данного показателя зависимости от параметров радиационной нагрузки (годовая доза, мощность экспозиционной дозы, удельная активность  $^{137}\text{Cs}$  в почве, удельная активность  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  в шишках) не обнаружено. Автор приводит весьма интересные данные частот встречаемости некротических поражений хвои на исследуемых лесных участках. Повышенная относительно уровня контрольной популяции частота встречаемости здоровой хвои на наименее загрязнённых участках и пониженная – на самом радиоактивно загрязнённом участке Брянской области могут быть следствием хронического радиационного воздействия в малых дозах. В качестве примера нарушения морфогенеза хвои в популяциях сосны обыкновенной автор приводит данные о частоте встречаемости треххвойных брахибласт в импактных популяциях, которая изменяется в пределах от 0.17 до 0.50%, превышая естественный уровень встречаемости этого морфоза до 5 раз.

Во 2-м разделе приведены данные оценки качества пыльцы сосны обыкновенной в условиях хронического облучения. Большинство из изученных клеток пыльцы имело нормальное морфологическое строение: правильное пыльцевое зерно и два воздушных мешка умеренной величины. Среди аномальных форм пыльцевых зёрен в исследуемых популяциях наиболее часто встречались пыльцевые зерна линзовидной формы, пыльца с утончённой экзиной, деградирующая пыльца, двумешковые пыльцевые зерна с недоразвитыми воздушными мешками, пыльцевые зерна с редуцированным телом. Наиболее распространённой аномалией являются пыльцевые зерна линзовидной формы, относительный вклад которых в общее число аномалий в разные годы составил от 46 до 93%. Связь частоты встречаемости этой аномалии с показателями радиационной обстановки отличалась в различные годы исследования, так, например в 2014 г. она коррелировала с расчётными значениями суммарной годовой поглощённой дозы в кронах деревьев ( $r=0.76$ ,  $p=0.076$ ) и удельной активностью  $^{137}\text{Cs}$  в поверхностном слое почвы 0–5 см ( $r=0.84$ ,  $p=0.035$ ), а в 2013 г. значимой зависимости не было выявлено. Обнаружена значимая корреляция частоты пыльцевых зёрен с редуцированным телом и суммарной годовой поглощённой дозой ( $r=0.83$ ,  $p=0.039$ ), дозой от  $\beta$ -излучения ( $r=0.86$ ,  $p=0.030$ ), удельными активностями  $^{137}\text{Cs}$  в почве на глубине 0–5 см ( $r=0.88$ ,  $p=0.021$ ), 10–15 см ( $r=0.98$ ,  $p=0.023$ ),

удельными активностями  $^{137}\text{Cs}$  ( $r=0.85$ ,  $p=0.032$ ) и  $^{90}\text{Sr}$  ( $r=0.76$ ,  $p=0.082$ ) в шишках. Частота встречаемости пыльцы с утончённой экзиной и с недоразвитыми воздушными мешками не имела значимой корреляции с уровнем радиационной нагрузки. Частота деградирующей пыльцы значимо коррелировала с удельной активностью  $^{137}\text{Cs}$  в почве на глубине 5–10 см ( $r=0.85$ ,  $p=0.033$ ). Помимо распространённых нарушений развития пыльцы были обнаружены и более редкие формы: пыльцевые зерна с одним, тремя, четырьмя воздушными мешками, гипертрофированное (диплоидное) пыльцевое зерно, воротничковой формы, разномешковые. Корреляционный анализ между частотами встречаемости редких форм пыльцы и параметрами радиационного воздействия не выявил линейной зависимости, хотя известно, что такая пыльца развивается у представителей родов *Pinus* только в экстремальных условиях среды. На основании полученных данных автор делает вывод, что хроническое облучение приводит к росту частоты аномальных пыльцевых зёрен у *Pinus sylvestris* L., особенно на участках, загрязнённых  $\beta$ -излучающими радионуклидами. В заключении к разделу об аномалиях пыльцы сосны обыкновенной автор приводит информацию о том, что полученные данные согласуются с результатами других исследований, в которых пониженная жизнеспособность пыльцы и повышенное число аномальных пыльцевых зёрен наблюдались на участках с мощностью дозы 1.8–5.4 мкГр/ч.

В 3-м разделе представлены результаты изучения генетического полиморфизма в популяциях сосны обыкновенной. Автор приводит генетическое расстояние по Нею, рассчитанное для исследуемых популяций, произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях, которое варьирует от 0.0050 до 0.0422, составляя в среднем 0.0185 и дендрограмму, демонстрирующую выраженную кластеризацию исследуемых популяций по Брянской и Гомельской областям. В пределах данных географических подгрупп экспериментальные участки чётко подразделяются по уровням радиационного воздействия. Автором делается заключение, что радиационное воздействие в малых дозах вносит вклад в кластеризацию популяций, хотя географический фактор играет более существенную роль в генетическом подразделении данных популяций. Далее в разделе приводятся данные о частоте и спектре 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. Частота мутаций, изменяющих ЭФП, во всех облучаемых популяциях в 1.5–2.8 раза выше, чем в контроле. Спектр мутаций на загрязнённых участках отличается от контрольного. В

исследованных популяциях выявлена корреляция на уровне тенденции частоты нуль-мутаций с суммарными годовыми дозами облучения кроны сосновых деревьев ( $D_{sum}$ ) ( $r=-0.67$ ,  $p=0.072$ ) и мощностью экспозиционной дозы ( $r=-0.70$ ,  $p=0.051$ ). Частота изменений электрофоретической подвижности показала значимую корреляцию с  $D_{sum}$  ( $r=0.72$ ,  $p=0.046$ ), мощностью экспозиционной дозы ( $r=0.79$ ,  $p=0.019$ ) и удельной активностью  $^{137}\text{Cs}$  в слое почвы 0–5 см ( $r=0.70$ ,  $p=0.054$ ). Автор заключает, что параметры генетического разнообразия и частота мутаций в природных популяциях являются чувствительными и информативными критериями при оценке генетических последствий хронического облучения в малых дозах, более высокая частота мутаций и среднее генетическое разнообразие на локус по Нею 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

В **Заключении** автор говорит о большой научной и практической ценности исследований, о биологических эффектах в природных популяциях растений и животных, длительное время (многих поколений) испытывающих хроническое облучение в малых дозах. Уникальные условия для изучения таких эффектов существуют на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате крупных радиационных аварий, таких как Чернобыльская. Автор подчеркивает комплексный характер исследования по оценке радиобиологических эффектов хронического воздействия на популяции сосны обыкновенной, затрагивающего разные уровни организации. В 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. Автором были использованы более современные методы анализа генетического полиморфизма, чем применяемые ранее, с их помощью было выявлено увеличение частоты мутаций и параметров генетического разнообразия. Используемые в работе 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.

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. 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.

### **Замечания к работе**

1. В работе представлена слишком краткая характеристика почв исследуемых участков. Целесообразно добавить данные по агрохимическим свойствам не ссылкой, а непосредственно в текст работы.

2. В работе не достаточно представлен анализ исследуемых показателей в зависимости от характеристик погодных условий.

3. Для анализа результатов полевых экспериментов можно было бы рекомендовать провести дополнительно дисперсионный анализ.

4. На стр. 7 в разделе Научная новизна говорится об отсутствии устойчивого значимого эффекта радиационного воздействия в диапазоне мощностей доз 10–130 мГр/год, правильней было бы говорить о годовых дозах облучения, как, впрочем, автор и поступает на стр. 51.

5. На стр. 51 неправильно употреблен термин *гомогенный древостой*, должно быть *однородный древостой (homogeneous stand)*. Кроме того, ближе всего к описываемым характеристикам исследуемых лесных участков термин *насаждение* – это однородный в определенных границах участок леса, занятый древесной и сопутствующей ей другой лесной растительностью.

6. В тексте диссертации упущены ссылки на некоторые литературные источники, приведенные в списке использованной литературы, как, например, Еловичева Я.К. [37], Жаворонков Л.П. [39], Захаров В.М. [43].

Указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, ее научной и практической значимости, не затрагивают основных выводов и не влияют на общую положительную оценку. Работа выполнена на современном научном и методическом уровнях, собран репрезентативный полевой материал, который обработан с использованием адекватных статистических методов, сделаны обоснованные выводы.

**Заключение.** Диссертация Макаренко Екатерины Сергеевны является завершенной научно-квалификационной работой. Результаты работы вносят существенный вклад в понимание закономерностей адаптации популяций сосны обыкновенной, одного из основных лесообразующих видов Российской Федерации, к условиям хронического облучения в зонах радиоактивного загрязнения, сформировавшихся в результате аварии на чернобыльской АЭС.

Диссертационная работа Макаренко Е.С. «Исследование морфологических параметров и генетического полиморфизма в природных популяциях сосны обыкновенной в условиях хронического радиационного воздействия» по актуальности, новизне, теоретическому и практическому значению полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Макаренко Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.01 – «Радиобиология».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научно-методической секции по вопросам лесоводства и биологии Ученого Совета ВНИИЛМ, протокол от 17 декабря 2018 года № 21.

Адрес ФБУ ВНИИЛМ: улица Институтская, 15, Пушкино, Московская область, 141202, Россия; тел.: +7 495 993 30 54; факс: +7 495 993 41 91; e-mail: [info@vniilm.ru](mailto:info@vniilm.ru); сайт: <http://www.vniilm.ru>

Главный научный сотрудник,  
д-р биол. наук, профессор  
[maradudin@mtu-net.ru](mailto:maradudin@mtu-net.ru)



И.И. Марадудин

Заведующий сектором анализа данных,  
канд. биол. наук  
[kalnin@vniilm.ru](mailto:kalnin@vniilm.ru)



В.В. Калнин

Заведующий отделом радиэкологии  
и экотоксикологии леса  
[razdayvodin@roslesrad.ru](mailto:razdayvodin@roslesrad.ru)



А.Н. Раздайводин

