

РАЗДЕЛ IV. БИОЛОГИЯ

Васильев Д.В., Дикарева Н.С., Гераськин С.А.

Многолетние исследования популяций сосны обыкновенной из районов с разным уровнем и спектром антропогенного загрязнения

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»
(Россия, Обнинск)

doi: 10.18411/lj-08-2020-15

idsp: ljjournal-08-2020-15

Аннотация

Выполнен сравнительный анализ результатов цитогенетических исследований семенного потомства популяций сосны (*Pinus sylvestris* L.) из районов Ленинградской АЭС, радиоактивного загрязнения в Брянской области, 30 км зоны Чернобыльской АЭС и Полесского радиационного заповедника.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, радиоактивное загрязнение, химическое загрязнение, цитогенетические нарушения.

Abstract

A comparative analysis of the results of cytogenetic studies of the seed offspring of pine (*Pinus sylvestris* L.) populations from the regions of the Leningrad NPP, radioactive contamination in the Bryansk region, 30 km of the Chernobyl NPP zone and the Polesky radiation reserve was performed.

Keywords: common pine, radioactive contamination, chemical contamination, cytogenetic disturbances.

Все большее число исследований показывает, что хроническое техногенное воздействие, даже в небольших дозах, способно влиять на направленность естественного отбора, повышая мутагенез и изменяя репродуктивную способность особей [1, 2, 3]. Механизмы таких изменений сложны, могут сильно модифицироваться условиями произрастания растений в разных природных зонах и сильно отличаться от тех, которые можно наблюдать в контролируемых условиях лабораторного эксперимента [4]. Поэтому корректная оценка эффектов хронического воздействия токсикантов на популяционном уровне должна основываться на анализе результатов долговременных комплексных натурных исследований, позволяющих изучить закономерности функционирования, динамику и направленность, протекающих в экосистемах биологических процессов в неблагоприятных условиях. Но в связи с методическими трудностями постановки подобных экспериментов, а также сложностью определения вклада в наблюдаемые эффекты малых доз и концентраций антропогенных факторов на фоне комплексного действия обычных экологических факторов внешней среды таких работ очень мало. Это порождает острый дефицит информации об индуцированных неблагоприятными факторами долгосрочных эффектах у представителей живой природы в естественной среде их обитания, что существенно затрудняет объективную оценку состояния экосистем [4].

Целью данного исследования была оценка репродуктивной способности и цитогенетических эффектов у популяций сосны обыкновенной из районов с разным уровнем и спектром антропогенного загрязнения.

Объекты и методика

Цитогенетические исследования проводились на семенном потомстве сосны обыкновенной. Репродуктивные органы хвойных растений, отличаются высокой чувствительностью к неблагоприятным факторам, сложностью организации и длительностью генеративного цикла. У сосны с момента закладки примордиев генеративных органов до созревания семян проходит 28 месяцев [5]. Созревают семена в конце сентября - начале октября,

но их высыпание из шишек начинается только в начале весны следующего года (после снижения влажности шишек до 17-20%). В условиях хронического действия техногенных факторов столь длительный цикл развития ведет к накоплению в неспециализированных инициальных клетках семян достаточного для индикации внешнего воздействия количества повреждений ДНК, реализация которых в аберрации происходит преимущественно в первом митозе [6].

Проведены однолетние (30 км зона ЧАЭС в 1995 и 2004 годах, Полесский радиационный заповедник в 2016 году) и многолетние (в Ленинградской области с 1997 по 2002 год и Брянской области с 2003 по 2016 год) исследования. Районы исследований охватывают территорию от северной Украины, до Ленинградской области. Расстояние между популяциями Брянской области, 30 км зоны ЧАЭС и Полесского заповедника составляет около 200 километров, а расстояние между ними и Ленинградскими популяциями 800–850 км.

В Ленинградской области в течение 6 лет изучали популяции сосны, произрастающие на территории регионального предприятия по переработке и хранению радиоактивных отходов ЛСК «Радон» (ЛСК) (рис. 1) и в городе Сосновый Бор (СоБ) расположенном в 5 км от предприятия. Контрольная популяция сосны была выбрана в 30 км от города в экологически чистом месте недалеко от посёлка Большая Ижора (К). В районе исследований основным источником антропогенного загрязнения являются предприятия ядерного комплекса. Суммарная доза внешнего излучения на местности за счет естественных и искусственных радионуклидов составляет в среднем 0.70 ± 0.03 мЗв/год [7]. В приземном воздухе г. Сосновый Бор эпизодически регистрировались искусственные радионуклиды ($^{134,137}\text{Cs}$, $^{131,133}\text{I}$, ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{60}Co , ^{95}Nb , ^{99}Mo). При работе ЛАЭС в штатном режиме, а так же при производстве ремонтных работ, в воздухе промплощадки практически постоянно присутствовали активированные продукты коррозии конструкционных материалов (^{54}Mn , ^{60}Co) - в 90% проб, и аэрозоли ^{131}I - в 60% проб. Наиболее широкий спектр искусственных радионуклидов регистрировался в приземном воздухе санитарно-защитной зоны Ленинградской АЭС ($^{134,137}\text{Cs}$, $^{131,133}\text{I}$, ^{51}Cr , ^{54}Mn , $^{58,60}\text{Co}$, ^{59}Fe , ^{95}Zr , ^{95}Nb , ^{140}La , ^{140}Ba , ^{99}Mo). На территории промплощадки ЛСК "Радон" в воздухе и аэрозольном веществе регистрировались аномально высокие концентрации Cr, Cu и Pb [8].

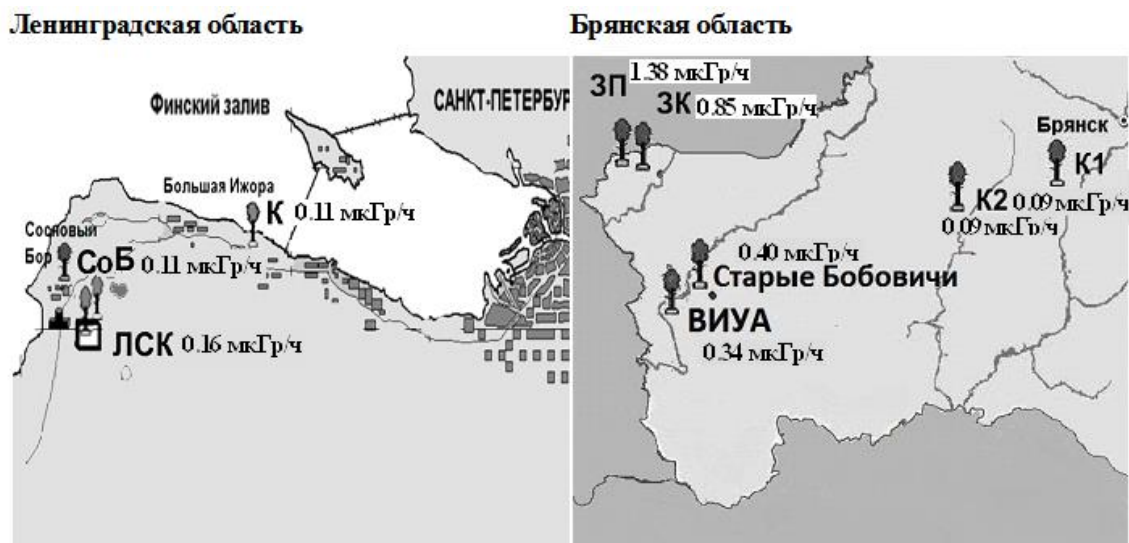
В Брянской области в течение 14 лет проводили исследования в Новозыбковском (ВИУА), Клинцовском (СБ) и Красногорском (ЗП, ЗК) районах. Контрольные участки находились в тех же климатических зонах на территориях Выгоничского и Унечского районов (К1 и К2) не подвергшихся радиоактивному загрязнению. Использование нескольких контрольных участков в Брянской области обусловлено необходимостью учета пространственной гетерогенности среды обитания популяций и является обязательным требованием в экологии импактных регионов [9]. Экспериментальные участки имеют контрастные уровни радиоактивного загрязнения, но сходны по условиям произрастания деревьев и уровню химического загрязнения. Поскольку в районах, где собирались пробы, нет крупных промышленных предприятий, то содержание в почвах тяжелых металлов и доступных растениям их подвижных форм не превышает допустимых уровней [10], а основным фактором, оказывающим неблагоприятное влияние на популяции сосны, является радиоактивное загрязнение.

В 1995 г. исследовались популяции из 30 км зоны ЧАЭС произрастающие в зоне сублетального поражения - район асфальто-бетонного завода (АБЗ) (поглощенная в год аварии (1986) доза составляла –10-20 Гр) [11]. В относительно «чистом» месте 30-км зоны – возле Поселка Черевач. В качестве контроля (К 3) был выбран чистый участок в Калужской области.

В 2004 году исследовались растения, непосредственно произрастающие на траншее, в которой захоронили радиоактивные материалы (МЗРО). В качестве контроля (К 4) использовались шишки собранные с деревьев, произрастающих возле поста ДАИ Парышев (Рис. 2).

В 2016 году исследования проводились в Полесском радиационном заповеднике (рис. 2) на участках Кожушки (Кож), Мосаны (Мос) и Синцы (Син), в качестве контроля

использовались шишки собранные с в этом же году на контрольных участках Брянской области (К1 и К2) (рис. 1).



30-км зона ЧАЭС, и

Полесский радиационный заповедник

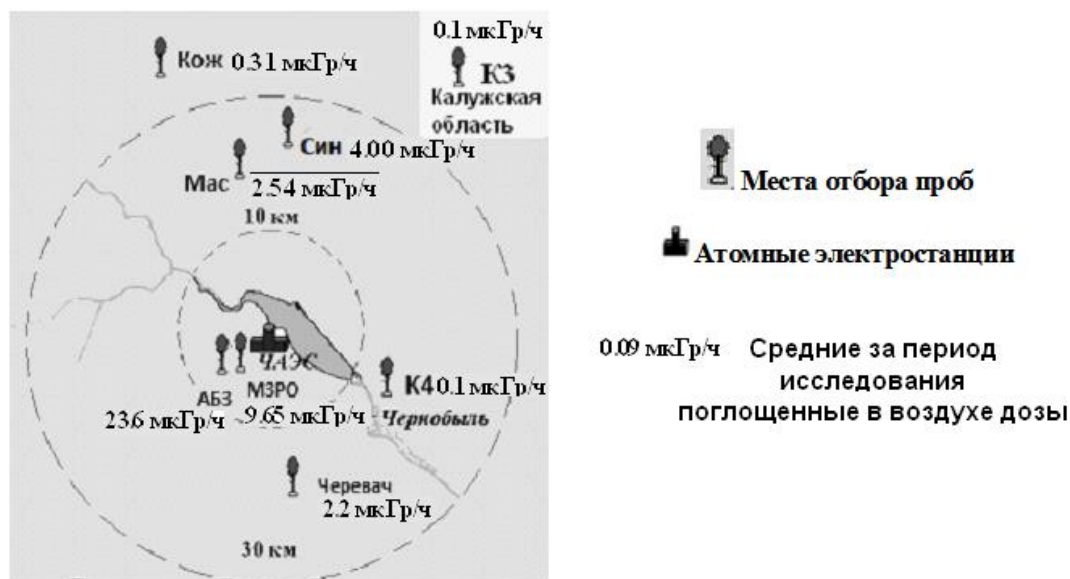


Рис. 1. Схемы районов исследований

Во время отбора проб на исследуемых участках проводился дозиметрический контроль дозиметром ДРГ-01Т (Россия) на высоте 1 м от поверхности земли по 5-7 раз под каждым деревом, с которого собирались шишки. В последующем, с учетом переводного коэффициента $P = 8.76 \times 10^{-3}$ Гр [12] рассчитывали мощность поглощенной в воздухе дозы γ -излучения (Табл. 1).

Экспериментальный материал (шишки) собирали в ноябре - начале декабря. На каждом из участков в пределах гомогенного древостоя бралось по 20-50 шишек с каждого из 20-29 деревьев на высоте 1.5-2 м от поверхности земли. Для дозревания и стратификации шишки выдерживали вне помещения до конца февраля. Затем их доставляли в лабораторию и хранили при комнатной температуре и низкой влажности до раскрытия и высыпания семян, которые обескырливали вручную.

Для синхронизации деления перед проращиванием семена сутки выдерживали в холодильнике при температуре 4 °С, а затем проращивали в термостате при 24 °С в чашках Петри на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге.

Для цитогенетического анализа корешки проростков длиной 7-10 мм. (в период пика первых, митозов [6, 13]) фиксировали в ацето-алкоголе (1:3). Для микроскопии использовали временные давленные препараты, в каждом из которых анализировали все ана-телофазные клетки (2600-16400 ана-телофаз на вариант опыта) и рассчитывали долю клеток с цитогенетическими нарушениями. При анализе спектра нарушений выделяли хроматидные (одиночные), хромосомные (двойные) мосты и фрагменты, многополюсные митозы, а также отставания хромосом. Отметим, что анафазным методом в клетках корневой меристемы проростков регистрируют нарушения, возникшие в период от образования гамет до созревания и сбора семян, поскольку индуцированные на вегетативной стадии (до цветения) перестройки хромосом элиминируются в мейозе за исключением не регистрируемых этим методом симметричных транслокаций и инверсий.

Экспериментальные данные проверяли по критерию Диксона на наличие выбросов, которые исключали из дальнейшего рассмотрения. Анализ данных проводился в Microsoft Office Excel 2007 методами вариационной статистики (дисперсионный и корреляционный анализ). Значимость различий между средними значениями определялась по критерию Стьюдента. Для оптимизации объема выборки применяли методику статистического анализа эмпирических распределений [14]. Статистическую значимость отличий оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Чтобы иметь возможность сравнивать сильно удалённые друг от друга популяции, находящиеся в разных экологических и климатических условиях проведено сравнение средних значений частоты абберантных клеток за период исследований у растений с контрольных участков (табл. 1). Поскольку они не испытывают значительных антропогенных нагрузок и в большей степени зависят от естественных факторов среды, характерных для районов их произрастания это позволяет определить характерные для исследуемых популяций частоты и спектр цитогенетических нарушений. Установлено, что исследуемые растения, как по уровню частоты цитогенетических нарушений, так и по их спектру можно разделить на три кластера соответствующие основным районам исследований (Табл. 1).

Таблица 1.

Средняя частота абберантных клеток за период исследований в корневой меристеме проростков семян с контрольных участков

Район исследований (кластер)	Вариант	АК, %, за весь период исследований	Спектр		
			f+m'	f'+m''	g+mp
Ленинградская область	К	0.60±0.03 ^{b2c2}	29.33±0.02 ^{b2c2}	47.24±0.02 ^{b2c2e2}	23.43±0.02 ^{b2c2e2}
30-км зона ЧАЭС	К4	0.74±0.07	13.27±0.04 ^{b2}	34.69±0.06 ^{a2}	52.04±0.06 ^{a2b1c1}
Брянская область	К1	0.85±0.02 ^{a2}	24.05±0.01 ^{a2e2}	29.53±0.01 ^{a2}	46.41±0.02 ^{a2e1}
	К2	0.84±0.02 ^{a2}	21.75±0.01 ^{a2}	31.83±0.02 ^{a2}	46.42±0.02 ^{a2e1}

Примечание. Участок К3 не рассматривается, поскольку в 1995 году не удалось найти контрольную популяцию в районе исследований, поэтому участок К3 находится на большом удалении (~ 600 км). АК – среднее число клеток с абберациями; f', m' – хроматидные (одиночные) фрагменты и мосты; f'', m'' – хромосомные (двойные) фрагменты и мосты; g – отставания хромосом; mp – трехполюсные митозы

Значимость отличия: от К- a1 - p < 1%, a2 - p < 0,1%; от К1 - b1 - p < 1%, b2 - p < 0,1%; от К2 - c1 - p < 1%, c2 - p < 0,1%; от К4 - e1 - p < 1%, e2 - p < 0,1%

Результаты анализа показали, что контрольные растения из Ленинградской области имеют статистически значимо меньшую частоту цитогенетических нарушений, чем контрольные растения из Брянской области. Причем контрольные популяции сосны Брянской области по частоте аббераций незначительно отличаются друг от друга ($p = 0.77$). Участок К4 по частоте цитогенетических нарушений не отличается от всех контрольных участков. Анализ спектра цитогенетических нарушений показал, что в клетках корневой меристемы проростков семян из Ленинградской области преобладают хромосомные нарушения, а у проростков из Брянской области и 30-км зоны ЧАЭС – геномные. При этом отличия между двумя контрольными популяциями Брянской области статистически не значимы. У популяции К4 число геномных нарушений статистически значимо выше, чем на всех других контрольных участках. Надо отметить, что в исследованиях, проводившихся в республике Коми, у контрольной популяции также значительно преобладали геномные абберации, при частоте цитогенетических нарушений близкой к участку К4 – $0.72 \pm 0.06\%$ [15].

Имея представление об особенностях изучаемых показателей можно проводить сравнение полученных в ходе исследований результатов. Ожидаемым является то, что наибольшая частота цитогенетических нарушений наблюдается у растений, испытывающих наибольший стресс. В нашем исследовании к ним относятся популяции сосны с участка АБЗ (рис. 2), где 1995 году уровень экспозиционных доз составлял 2690 мкР/ч. (табл. 1). По мере снижения уровня радиоактивного загрязнения участков и увеличения времени прошедшего с момента аварии на ЧАЭС частота встречаемости цитогенетических нарушений уменьшается. Если на участке АБЗ в 1995 г. частота цитогенетических нарушений составляла 4.8 %, то на участке МЗРО в 2004 г. (1102 мкР/ч) 3.5 %, в Полесском радиационном заповеднике в 2016 г. 1.7 - 2.7 % при экспозиционных дозах 35.5 - 456.8 мкР/ч.

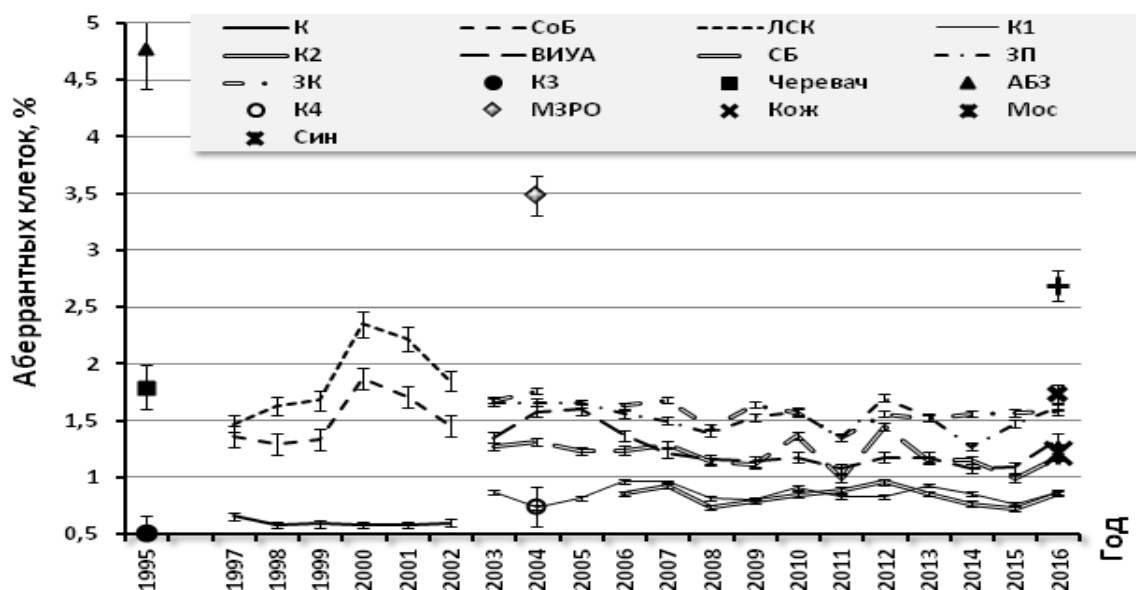


Рис. 2. Частота цитогенетических нарушений в корневой меристеме проростков семян сосны обыкновенной

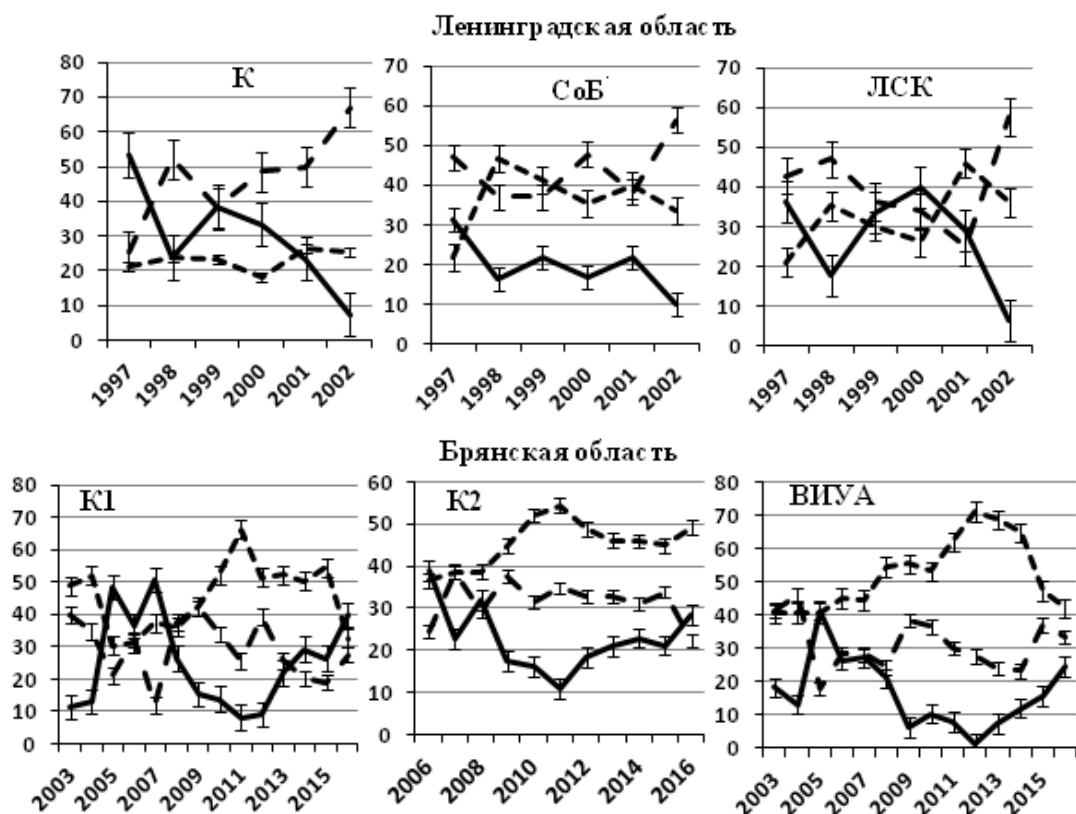
Особый интерес представляют исследования растений в Ленинградской и Брянской областях, поскольку они проводились последовательно в течение ряда лет, что позволяет также изучить и динамику изменения изучаемых показателей во времени. Было установлено, что частота цитогенетических нарушений у проростков семян импактных популяций сосны, как в Ленинградской, так и в Брянской области статистически значимо выше, чем в контроле (рис. 2). При этом процент абберантных клеток в импактных популяциях Ленинградской области сопоставим или даже выше чем у популяций ЗП и ЗК, населяющих наиболее загрязненные радионуклидами участки Брянской области, а также участки Кож и Мос из Полесского радиационного заповедника при значительном различии уровней экспозиционных доз. И если в Брянской области повышенная частота цитогенетических нарушений значимо коррелирует с

уровнем поглощенных доз ($r = 0.84 - 0.93$, $p < 0.05$) то в Ленинградской области такая зависимость отсутствует. Следовательно, можно предположить, что в Ленинградской области изученные популяции сосны испытывают дополнительный стресс от неизвестных факторов, скорее всего от химического загрязнения, сила действия которого сопоставима с силой действия ионизирующего излучения на популяции сосны из районов пострадавших в результате аварии на ЧАЭС.

Этот вывод подтверждает анализ спектра цитогенетических нарушений (рис. 4) обоснованный тем, что механизм формирования aberrаций зависит от природы действующих факторов. Техногенные поллютанты конечно не создают новые биологические феномены (т.е. новые типы цитогенетических нарушений), которые не наблюдались бы и в контроле, но при этом с разной частотой инициируют появление различных видов структурных нарушений хромосом, и митотических аномалий [16, 17]. Считается, что ионизирующее излучение в основном индуцирует крупные генетические изменения (делеции и перестройки) [18, 19], а многие химические мутагены вызывают главным образом генные мутации. Для действия тяжелых металлов характерно преобладание нарушений митоза [20, 21]. В этой связи особое внимание обращает присутствие в клетках проростков семян сосны с импактных участков Ленинградской области и отсутствие в соответствующем контроле (К) трехполосных митозов (рис. 3), возникновение которых связывают [2, 22] с повреждением веретена деления. В совокупности с данными о химическом загрязнении исследуемого района Ленинградской области [8] и дозиметрического контроля, полученные результаты позволяют предположить, что именно тяжелые металлы могут оказывать значительное влияние на исследованные популяции сосны.

Для исследуемых растений из Брянской области характерен более высокий по сравнению с контролем уровень aberrаций хромосомного типа являющихся маркером действия ионизирующих излучений (рис. 3). Причем в большинстве случаев это различие статистически значимо. На участках из 30 км зоны ЧАЭС и Полесского радиационного заповедника (за исключением участка Мас) также преобладают хромосомные aberrации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о радиационной природе факторов влияющих на импактные популяции из районов пострадавших от аварии на ЧАЭС.



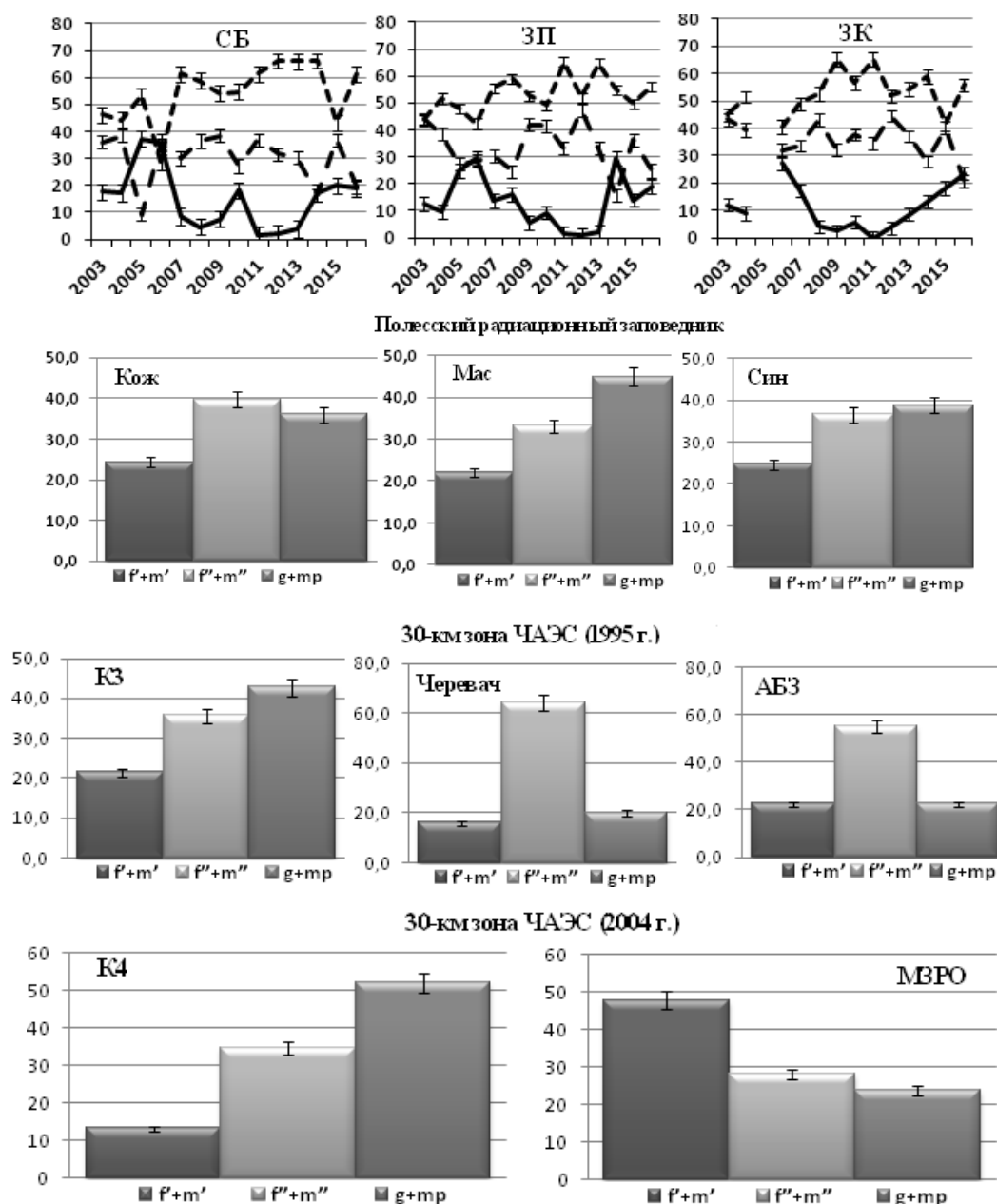


Рис. 3. Спектр цитогенетических нарушений в корневой меристеме проростков семян сосны обыкновенной. По оси абсцисс – год наблюдений; по оси ординат – частота aberrаций, % — хроматидные (одиночные) фрагменты и мосты; - - - хромосомные (двойные) фрагменты и мосты; ····· отставания хромосом и трехполосные митозы,

Выводы

Результаты многолетних исследований позволили выявить повышенную частоту цитогенетических нарушений в корневой меристеме проростков семян сосны обыкновенной на импактных участках из разных регионов с разным уровнем и спектром антропогенного загрязнения.

Если в зоне радиоактивного загрязнения ЧАЭС причиной повышенной частоты aberrаций являются высокие уровни радиоактивного загрязнения, то в районе Ленинградской АЭС повышенная частота цитогенетических нарушений вызвана другими антропогенными факторами природу которых позволил выявить анализ спектра цитогенетических нарушений. Установлено, что в Ленинградской области в импактных популяциях наблюдается более высокий по сравнению с контролем уровень геномных нарушений, характерный для действия тяжелых металлов, а в районах радиоактивного загрязнения от аварии на ЧАЭС в популяциях имеется более высокий по сравнению с контролем уровень хромосомных нарушений,

характерный для действия ионизирующих излучений. При этом загрязнение тяжелыми металлами атмосферного воздуха и почв в районе Ленинградской АЭС и города Сосновый Бор способно оказывать значительное мутагенное воздействие на популяции сосны сравнимое с таковым в районах радиоактивного загрязнения Брянской области.

1. Чернобыльской АЭС // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 6. С. 922–929.
2. Micieta K., Murin G. Three species of genus *Pinus* suitable as bioindicators of polluted environment // *Water, Air, Soil Pollution*. 1998. V. 104. P. 413–422.
3. Федотов И.С., Кальченко В.А., Игонина Е.В., Рубанович А.В. Радиационно-генетические последствия облучения популяции сосны обыкновенной в зоне аварии на ЧАЭС // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2006. Т. 46. Вып. 3. С. 268–278.
4. Garnier-Laplace, J., Della-Vedova, C., Andersson, P., Copplestone, D., Cailes, C., Beresford, N.A., Howard, B.J., Howe, P., Whitehouse, P., 2010. A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *J. Radiol. Prot.* 30, 215–233.
5. Козубов Г.М., Таскаев А.И. Радиобиологические и радиоэкологические исследования древесных растений. С.-П.: Наука, 1994. 256 с.
6. Geraskin S.A., Dikarev V.G., Dikareva N.S., Vasiliyev D.V., Oudalova A.A., Alexakhin R.M., Zimina L.M., Zimin V.L., Blinova L.D. Bioindication of the anthropogenic effects on micropopulation of *Pinus sylvestris* L. in the vicinity of a plant for the storage and processing of radioactive waste and in the Chernobyl NPP zone // *Journal of Environmental Radioactivity*. 2003. Т. 66. № 1–2. P. 171–180.
7. Блинова Л.Д. Радиоэкологический мониторинг атмосферы и гидросферы в районе расположения объектов ядерного комплекса (на примере города Сосновый Бор). Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, Обнинск, 1998. 23 с.
8. Блинова Л.Д., Небадаевская Н.Н., Зимина Л.М. и др. Ленинградская АЭС: экологический мониторинг // *Научный информационный методический бюллетень*. 1997. № 1–2. С. 27–38.
9. Воробейчик Е.Л., Козлов М.В. Воздействие точечных источников эмиссии поллютантов на наземные экосистемы: методология исследований, экспериментальные схемы, распространенные ошибки // *Экология*. 2012. № 2. С. 83–91.
10. Гераськин С.А., Дикарева Н.С., Удалова А.А. и др. Цитогенетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008. Т. 48. Вып. 5. С. 584–595.
11. Кальченко В.А., Федотов И.С. Генетические эффекты острого и хронического воздействия ионизирующих излучений на *Pinus sylvestris* L., произрастающих в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС // *Генетика*. 2001. Т. 37. № 4. С. 427–447.
12. Машкович В.П., Кудрявцева А.В. Защита от ионизирующих излучений. М.: АП «Столица», 2013. 496 с.
13. Шевченко В.А., Печкуренок В.Л., Абрамов В.И. Радиационная генетика природных популяций. М.: Наука, 1992. 221 с.
14. Гераськин С.А., Фесенко С.В., Черняева Л.Г., Санжарова Н.И. Статистические методы анализа эмпирических распределений коэффициентов накопления радионуклидов растениями // *Сельскохозяйственная биология*. 1994. № 1. С. 13–37.
15. Евсева Т. И., Гераськин С. А., Белых Е. С., Майстренко Т. А., Brown J. E. Оценка репродуктивной способности *Pinus sylvestris*, произрастающей в условиях хронического воздействия радионуклидов уранового и ториевого рядов. // *Экология*, 2011, № 5, с. 355–360
16. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. Т. 2. М.: Мир, 1990. 378 с.
17. Евсева Т. И., Гераськин С. А., Вахрушева О. М. Оценка вклада факторов радиационной и химической природы в формирование биологических эффектов в популяции горошка мышиного с территории складирования отходов радиевого производства (пос. Водный, Республика Коми) // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54. № 1. С. 85–96.
18. Репарация ДНК и мутагенез. Научный комитет ООН по действию атомной радиации. Доклад Генеральной ассамблеи за 1998 год. 45 с.
19. Streffer C., Bolt H., Follesdal D., Hall P., Hengstler J.G., Jakob P., Oughton D., Prieb K., Rehbinder E., Swaton E. Low dose exposures in the environment. Dose-effect relations and risk evaluation. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2004. 471 p.
20. Гераськин С.А., Сарапульцева Е.И., Цаценко Л.В., Глазер В.М., Абилов С.К., Смирнова С.Г., Замулаева И.А., Комарова Л.Н., Степченкова Е.И., Инге-Вечтомов С.Г., Ким А.И., Крутенко Д.В., Евсева Т.И., Михайлова Г.Ф., Амосова Н.В. Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг М.: Академия, 2010. 208 с.
21. Seoane A.I., Dulout F.N., Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay, *Mutat. Res.* 490 (2001) 99–106.
22. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 263 с.