

УДК [57+61]:539.1.04:582.475.4:577.15

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧАЕМЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2012 г. П. Ю. Волкова, С. А. Гераськин\*

*ГНУ “Всероссийский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии” РАСХН, Обнинск*

Изучен полиморфизм фермента супероксиддисмутазы в популяциях сосны обыкновенной из загрязненных радионуклидами районов Брянской области. Показано, что увеличение радиоактивного загрязнения участков до 39 кБк/кг ведет к достоверному росту частоты мутаций изоферментных локусов, эффективного числа аллелей, внутривидового разнообразия и частоты редких морф. Изменение генетической структуры исследованных популяций происходит за счет увеличения частоты редких аллелей.

*Сосна обыкновенная, авария на Чернобыльской АЭС, радиоактивное загрязнение, хроническое облучение, изоферменты, генетическая изменчивость, редкие морфы, нуль-аллели.*

Для принятия научно обоснованных мер по предотвращению деградации лесных фитоценозов необходимо изучение причин и механизмов их антропогенной трансформации. Генетическая структура природных популяций динамично изменяется, обеспечивая наибольшую приспособленность к текущему состоянию окружающей среды. Способность популяции к адаптации зависит от величины генетического полиморфизма признаков, по которым идет отбор [1, 2]. Техногенное воздействие способно менять величину и структуру внутривидовой изменчивости [3, 4], причем антропогенные факторы могут вызывать изменения, не совпадающие с характером и темпами эволюционного развития видов. Нарушения генетической структуры популяций видов с длительным жизненным циклом, таких, как сосна, вследствие потери ценных аллельных вариантов и их комбинаций, ведет к снижению пластичности и адаптивности последующих поколений. Снижение устойчивости видов-доминантов ведет к изменениям в структуре ценоза, что может повлечь за собой утрату зависимых от вида-эдификатора биологических видов [5].

Авария на Чернобыльской АЭС привела к радиоактивному загрязнению огромной территории, значительную часть которой занимают леса. Лес представляет собой своеобразный “фильтр” для оседающих из воздуха радионуклидов и других техногенных поллютантов. Хвойные деревья характеризуются высокой задерживающей спо-

собностью и низкой скоростью самоочищения [6]. В результате средняя плотность радиоактивного загрязнения леса, как правило, выше, чем окружающих территорий. Массовая гибель облученных в высоких дозах (60–100 Гр) сосновых деревьев в ближней зоне Чернобыльской АЭС в первые годы после аварии [7] подтвердила их высокую радиочувствительность. Гораздо менее очевидны отдаленные эффекты хронического радиационного воздействия. В многолетних исследованиях на Восточно-Уральском радиоактивном следе (ВУРС) [8] и в 30-километровой зоне Чернобыльской АЭС [9] показано, что в популяциях растений, населяющих участки с высоким уровнем радиоактивного загрязнения (поглощенная за вегетационный период доза составляла несколько Гр), хроническое радиационное воздействие является экологическим фактором, влияющим на генетическую структуру популяций. Однако до настоящего времени остается открытым вопрос: какие изменения происходят в генофонде популяций сосны при хроническом низкодозовом воздействии, уровень которого недостаточен для проявления радиационно-индуцированных фенотипических эффектов? Нет полного понимания того, как сказываются на репродуктивной способности, адаптивной дифференциации и, в целом, судьбе населяющих такие территории популяций характерные для этих условий [10, 11] повышенные частоты генетических и цитогенетических нарушений в соматических и половых клетках.

С появлением электрофоретических методов анализа, позволяющих установить число и частоту аллельных вариантов ферментов, участвующих в формировании генетической изменчивости по

\* Адресат для корреспонденции: 249032 Обнинск, Калужской обл., Киевское ш., 109 км, ГНУ ВНИИСХРАЭ РАСХН; тел.: (48439) 9-69-64; факс (48439) 6-80-66; e-mail: stgeraskin@gmail.com.

каждому из изученных локусов, а также соотношение гомозигот и гетерозигот, открылась возможность количественной оценки генетической изменчивости и дифференциации популяций, населяющих контрастные по экологическим условиям территории. Мутации локусов, кодирующих синтез изоферментов, имеют кодоминантный тип наследования и проявляются в семенах первого поколения. Это позволяет изучать генетическую структуру популяций без проведения скрещиваний или изучения родословных, что значительно сокращает необходимое для исследований время без потери информативности. В настоящее время анализ полиморфизма ферментов стал одним из важнейших методов изучения генетических процессов в природных популяциях [3].

Цель работы — анализ полиморфизма изофермента супероксиддисмутазы (SOD) в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на ЧАЭС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

**Объект исследования.** Сосна обыкновенная, *Pinus sylvestris* L. — основной лесообразующий вид Северной Евразии. В природных сообществах сосна относится к эдификаторным видам, определяющим лицо фитоценоза и в существенной степени влияющим на жизнь других обитателей леса. Сосна обыкновенная также является эврибионтным видом с широким диапазоном толерантности к естественным факторам. Данные о высокой радиочувствительности хвойных растений были получены еще в начале 60-х годов прошлого века в Брукхейвенской лаборатории США [12] и подтверждены в ходе масштабного эксперимента “ЭККОС” на Южном Урале [8]. Наиболее чувствительны к повреждающим воздействиям репродуктивные органы хвойных растений, отличающиеся сложностью организации и длительностью генеративного цикла [7]. Особенностью репродуктивной системы хвойных растений является наличие в семени гаплоидного эндосперма (мегагаметофита), генетически идентичного материнской гамете, что делает возможным прямое определение гаплотипа и рецессивных мутаций.

**Район исследования.** Исследование проводилось в наиболее загрязненных радионуклидами районах Брянской области — Новозыбковском, Клинцовском и Красногорском. Экспериментальные участки ВИУА, Старые Бобовичи (СБ), Заборье поле (ЗП), Заборье кладбище (ЗК) расположены приблизительно на 200 км северо-восточнее ЧАЭС (рис. 1). Непосредственно после аварии радиоактивное загрязнение некоторых участков на этой территории превышало 1 МБк/м<sup>2</sup> [13]. Участки выбирались с учетом го-

могенности древостоя и высокого представительства сосновых деревьев в фитоценозе, однородности по почвенно-климатическим характеристикам и физико-химическим свойствам почв, уровню техногенного загрязнения. Контрольный участок (К) расположен в Выгоничском районе Брянской области.

Экспериментальные популяции сосны выбирались таким образом, чтобы обеспечить равномерный шаг по мощности экспозиционной дозы в местах их произрастания. Мощность экспозиционной дозы измеряли с помощью дозиметра ДРГ-01Т на высоте 1 м от поверхности земли под каждым деревом, с которого отбирали шишки. Мощность дозы в воздухе на экспериментальных участках менялась в пределах 0.37–1.21 мкГр/ч (0.1 мкГр/ч на контрольном участке) [11]. Подробное описание экспериментальных участков представлено в [11, 14].

**Отбор проб для исследования.** В декабре 2009 г. были отобраны пробы почвы и биологического материала (шишки) для определения уровней загрязнения радионуклидами и тяжелыми металлами, а также проведения изоферментного анализа. Образцы почвы на каждом участке отбирали по слоям 0–5, 5–10 и 10–15 см под деревом, где была зафиксирована максимальная на участке мощность дозы. На каждом из пяти участков шишки собирали на высоте 1.5–2.0 м от поверхности земли с 20–29 деревьев 30–50-летнего возраста в пределах гомогенного древостоя, по 30–50 штук с каждого дерева. Для созревания и стратификации шишки выдерживали вне помещения до конца февраля. Затем шишки доставляли в лабораторию и хранили при комнатной температуре и низкой влажности до раскрытия и высыпания семян, которые обескрыливали вручную. Для электрофоретического анализа использовали только свободно высыпавшиеся, хорошо выполненные семена.

**Изоферментный анализ.** Ферменты экстрагировали из эндоспермов и зародышей семян сосны обыкновенной, собранных индивидуально с каждого дерева. Каждый эндосперм и зародыш гомогенизировали в 100 мкл экстрагирующего буфера: 1%-ный раствор тритона X-100 и 0.2%-ный раствор β-меркаптоэтанола. Разделение экстрактов проводили в вертикальных пластинах 7.5%-ного полиакриламидного геля в трис-HCl буфере с pH 8.0 на установке “PROTEAN II xi Cell”. Полимеризацию геля проводили в течение 30 мин. В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый с pH 8.9. Время электрофореза составляло 1.5–2 ч при токе 60–80 мА. Гистохимическое окрашивание выполнялось по [15] с модификациями. Было проанализировано в среднем по 15 эндоспермов и зародышей с каждого дерева, всего 6500 локус-тестов.

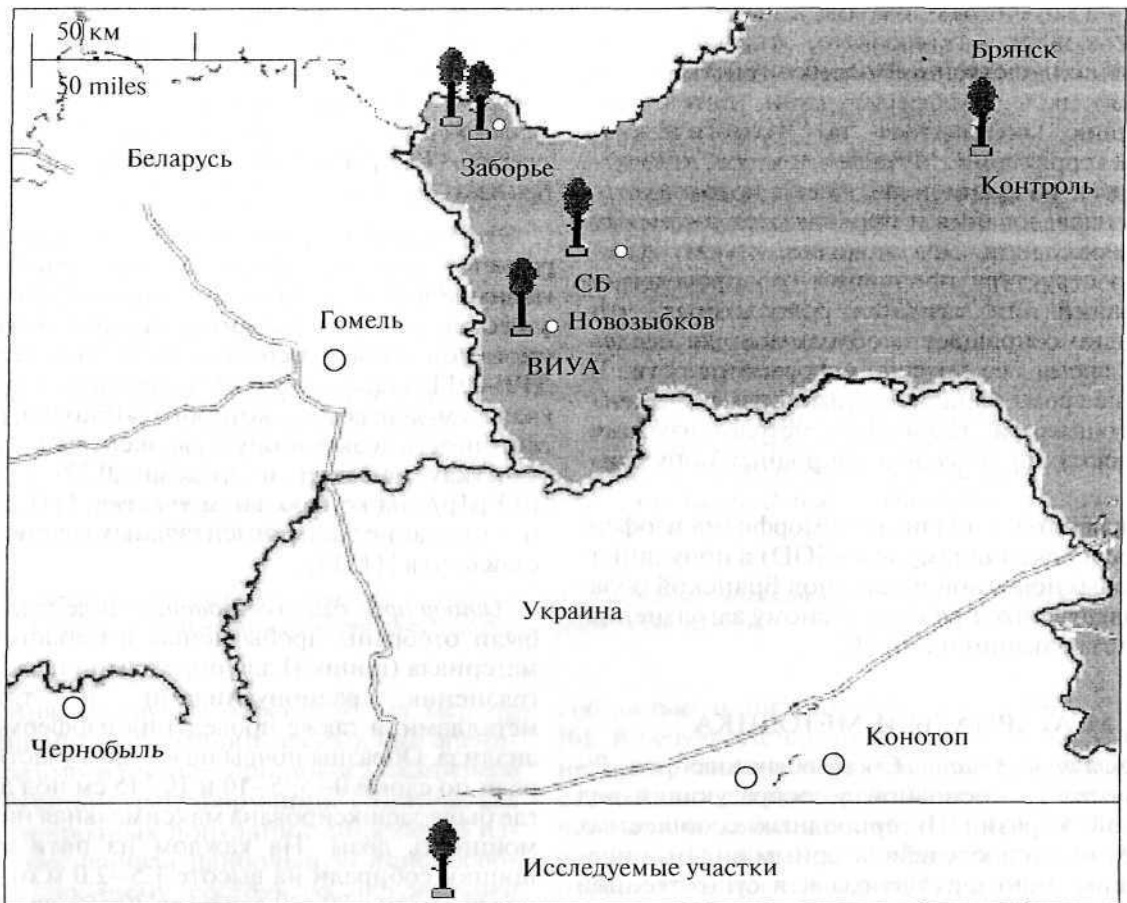


Рис. 1. Расположение экспериментальных участков в Брянской области.

Идентификацию аллозимов проводили по их относительной подвижности. Наиболее часто встречающийся аллель обозначали 1.00. Остальные аллели этого локуса обозначали в соответствии с их электрофоретической подвижностью относительно аллеля 1.00. Варианты с отсутствием ферментативной активности обозначали буквой  $n$ .

*Статистический анализ экспериментальных данных.* Для каждой популяции рассчитывали частоты аллелей и показатели, характеризующие генетическую изменчивость. Для сравнения фенотипического разнообразия популяций использовали индекс Животовского ( $\mu$ ), который изменяется от 1 до  $m$ , где  $m$  — количество аллелей и интерпретируется как среднее число фенотипов в выборке. Индекс Животовского вычисляли по формуле:

$$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2,$$

где  $p_1, \dots, p_m$  — частоты аллелей в популяции.

Для детализации аллозимной структуры популяций оценивали долю редких морф:

$$h_\mu = 1 - (\mu/m).$$

Для оценки аллельного разнообразия популяций используют сумму аллелей данного локуса. Но более информативно их число не в абсолютном выражении, а с учетом частоты встречаемости: чем меньше частота аллеля, тем меньший вклад он вносит в аллельное разнообразие локуса. Одной из мер этого разнообразия является эффективное число аллелей  $n_e$ , которое определяли по формуле:

$$n_e = 1/\sum p_i^2.$$

Достоверность различий по частоте встречаемости аллелей между контрольной и экспериментальными популяциями оценивали с помощью модифицированного  $\chi^2$ -критерия, рекомендованного [16] для случая небольших объемов выборок и наличия редких фенотипов в популяции. Статистика критерия и число степеней свободы рассчитывались как  $\chi_G^2 = c\chi^2$ ;  $\nu_G = c\nu$ , где  $c$  — поправка, учитывающая малость ожидаемых численностей некоторых аллелей. Для определения

**Таблица 1.** Радиоактивное загрязнение экспериментальных участков и поглощенные в генеративных органах сосны дозы

Участок	$^{137}\text{Cs}$ , 0–5 см, Бк/кг	$D_\gamma$ , мГр/год	$D_\beta$ , мГр/год	$D_{\text{общ}}$ , мГр/год
К	73.2	0.12	0.01	0.13
ВИУА	1570	6.6	0.3	6.9
СБ	16900	22.7	0.2	22.9
ЗП	39190	90.2	1.2	91.4
ЗК	96900	129.4	0.5	129.9

различий между средними значениями использовали критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Техногенное загрязнение экспериментальных участков.* Почвы всех экспериментальных участков дерново-подзолистые супесчаные, близки по физико-химическим свойствам, а содержание тяжелых металлов и доступных растениям их подвижных форм не превышает допустимых уровней [11, 14].

Качественно иная картина наблюдается в отношении радиоактивного загрязнения экспериментальных участков, основной вклад в которое вносит  $^{137}\text{Cs}$  — ведущий дозообразующий радионуклид на загрязненных в результате аварии на ЧАЭС территориях. Удельная активность этого радионуклида в 5-см слое почвы изменяется, в зависимости от участка, в диапазоне 1570–96900 Бк/кг (табл. 1). Таким образом, радиоактивное загрязнение экспериментальных участков в 20–1320 раз превышает удельную активность  $^{137}\text{Cs}$  на контрольном участке. Содержание радионуклидов в шишках деревьев с загрязненных радионуклидами участков достоверно превышает этот параметр для контрольных популяций. Причем содержание  $^{137}\text{Cs}$  в шишках всех исследованных участков выше содержания  $^{90}\text{Sr}$  как минимум на порядок. Максимальное содержание  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  в шишках экспериментальных участков превышает этот параметр для контрольных участков в 315 и 78 раз соответственно [11].

Для оценки дозовых нагрузок на генеративные органы сосновых деревьев была разработана дозиметрическая модель [17]. Результаты расчета поглощенных в генеративных органах сосны доз приведены в табл. 1. Основной вклад в формирование дозы на генеративные органы сосны вносит содержащийся в верхнем 10-см слое почвы  $^{137}\text{Cs}$ . Вклад  $\beta$ -излучения, в зависимости от участка, составляет 0.4–9.3%. При этом поглощенная в генеративных органах доза от распределенных в пологом лесу радионуклидов формируется главным образом за счет  $\beta$ -излучения.

*Полиморфизм SOD в популяциях сосны обыкновенной.* Стабильное существование популяции в меняющихся условиях среды определяется уровнем ее аллельного и генотипического разнообразия. В исследуемых популяциях был проведен анализ полиморфизма фермента супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1). Выбор SOD обусловлен множественностью аллельных форм этого фермента; важной ролью, которую он играет в противодействии оксидативному стрессу; хорошей идентификацией продуктов аллелей при электрофорезе. После гистохимического окрашивания на гелях наблюдали три зоны ферментативной активности, что свидетельствует о полигенном контроле синтеза супероксиддисмутаза. Лocus SOD-2 и SOD-3 мономорфны на всех исследуемых участках, locus SOD-1 на участках ЗК и ЗП представлен двумя аллелями. Расположение вариантов на гелях представлено на рис. 2. Интересно, что в работе [18] было выявлено четыре локуса, кодирующих синтез SOD в популяциях сосны, тогда как в нашем исследовании и в исследовании [19] таких локусов было три. Тем не менее, во всех известных нам работах только один locus SOD характеризовался расщеплением на два аллеля, остальные были мономорфны.

Была оценена частота каждого аллеля. Из представленных в табл. 2 данных следует, что с ростом поглощенной генеративными органами растений дозы повышается вероятность индукции новых аллельных вариантов фермента и соответственно частота появления редких аллельных форм.

*Частота мутаций изоферментных локусов.* Оценивали три вида мутаций изоферментных локусов — нуль-мутации, для которых характерно полное прекращение биосинтеза белка; мутации, меняющие структуру и заряд изофермента идентифицируемые по изменению электрофоретической подвижности продукта локуса; дубликации (табл. 3).

Как и в работах [20, 21], изменения электрофоретической подвижности и дубликации наблюдались с гораздо меньшей частотой, чем нуль-мута-

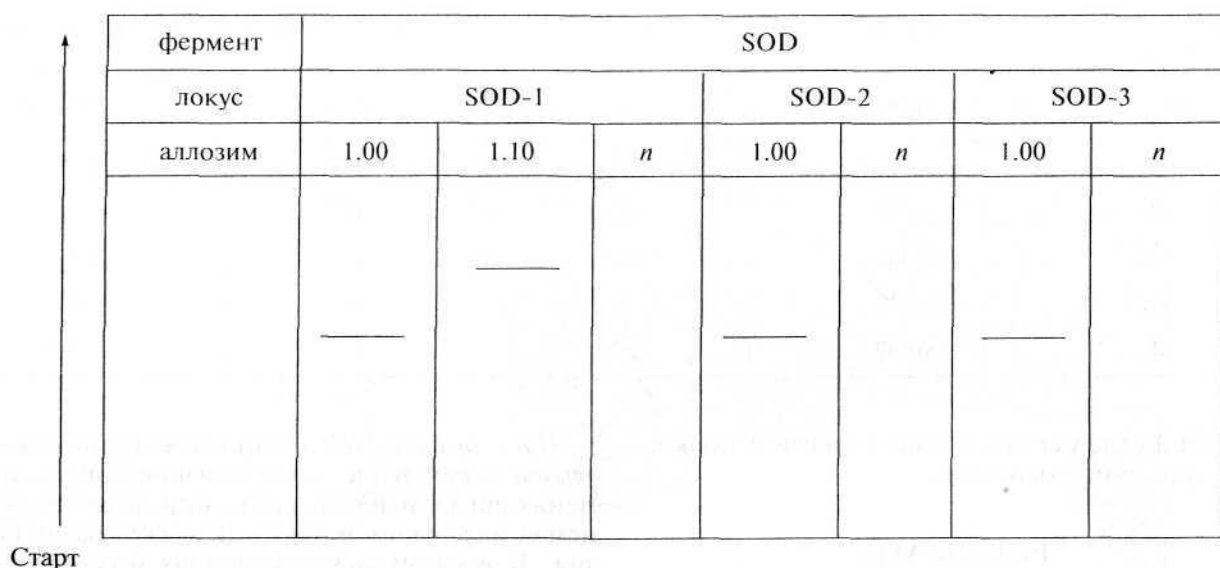


Рис. 2. Схематическое изображение и обозначение аллозимов трех локусов SOD.

ции, и только на наиболее загрязненных участках. В контрольной популяции мутаций обнаружено не было. Общая частота мутаций (рис. 3) значительно ( $r = 98\%$ ,  $p < 0.05$ ) увеличивается вместе с уровнем радиоактивного загрязнения. Аномальные типы наследования продуктов ферментных локусов, обнаруженные в эндоспермах (мегагаметофитах) при электрофорезе, представляют собой главным образом результат делеций или рекомбинаций структурных генов в материнских гаметах [3]. Достоверное увеличение частоты нуль-мутаций наблюдалось в популяциях с наиболее загрязненных участков: ЗП и ЗК (рис. 4). Таким образом, хроническое радиационное воздействие в изученном диапазоне доз ведет к достоверному увеличению частоты мутационных событий в популяциях

сосны обыкновенной. Параллельно с оценкой частоты мутаций в эндоспермах оценивалась частота мутаций в соответствующих зародышах. Не было обнаружено (рис. 5) достоверных различий в частотах мутаций в эндоспермах и зародышах.

*Внутрипопуляционное разнообразие.* Внутрипопуляционное разнообразие оценивали с помощью индекса Животовского (среднее число аллелей с учетом их частоты). По значению этого показателя изученные локусы принято делить [16] на три группы: мономорфные, со средним ( $3 > \mu > 1$ ) и высоким ( $\mu > 3$ ) уровнем изменчивости. Локусы SOD-2 и SOD-3 мономорфны во всех популяциях, как и локус SOD-1 в популяциях К, ВИУА и СБ. Популяции сосны обыкновенной с участков ЗП и ЗК характеризуются средним уров-

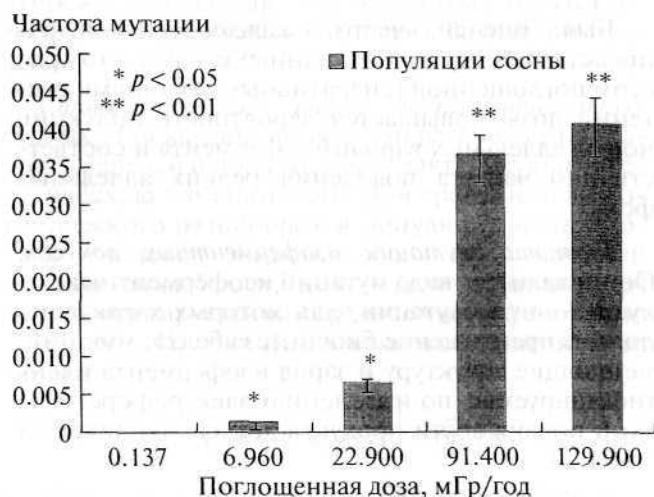


Рис. 3. Общая частота мутаций в популяциях сосны обыкновенной.

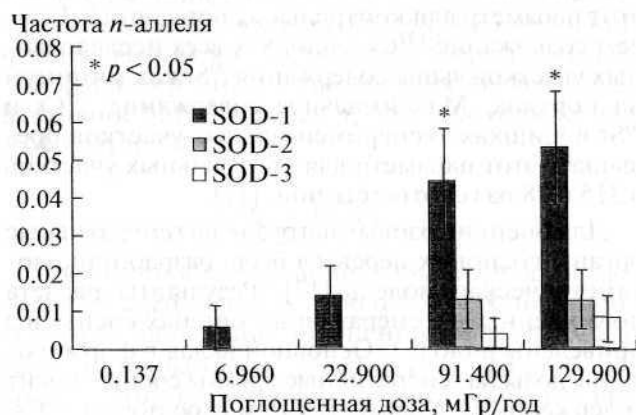


Рис. 4. Частота нуль-мутаций в популяциях сосны обыкновенной.

нем изменчивости по локусу SOD-1. Индексы фенотипического разнообразия в этих популяциях значительно отличаются (рис. 6) от контроля. Локусов с высоким уровнем изменчивости в нашем исследовании обнаружено не было. Тем не менее представленные данные позволяют заключить, что генетические процессы в исследуемых популяциях ведут к увеличению фенотипического разнообразия.

Для детализации аллозимной структуры была оценена доля редких морф в популяции. Этот показатель увеличивается (рис. 7) вместе с уровнем радиоактивного загрязнения ( $r = 0.91$ ,  $p < 0.05$ ). Т.е. изменение генетической структуры популяций в условиях хронического облучения происходит за счет увеличения частоты редких аллелей. Было отмечено также увеличение эффективного числа аллелей локуса SOD-1 в хронически облучаемых популяциях по сравнению с контролем (табл. 4). Это связано с тем, что в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной редкие аллели вносят большой вклад в аллельное разнообразие.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Формой существования растений и животных в природе является популяция, поэтому разрабатываемые в настоящее время принципы радиационной защиты биоты должны основываться на ясном понимании генетических процессов, которые происходят в популяциях, развивающихся в условиях хронического радиационного воздействия. Особое значение популяционного уровня существования и развития жизни на Земле состоит в том, что через него осуществляется как генетическая преемственность поколений, так и регуляция биологически важных свойств. В нормальных условиях генофонд популяции устойчиво сохраняется во времени, однако в условиях резко меняющейся среды генетическая структура популяций способна кардинально перестраиваться. Поддержание гомеостаза в природных системах обеспечивается не только адаптацией отдельных организмов, реализуемой через коррекцию биохимических и физиологических процессов, но и популяционными механизмами. Это одна из причин того, что наблюдаемые в природных условиях эффекты хронического облучения в малых дозах существенно отличаются от тех, которые фиксируют в контролируемых условиях лабораторного эксперимента.

Из результатов нашего и других [10, 21, 22] исследований следует, что хроническое облучение даже в относительно низких дозах может вносить существенный вклад в индукцию у сосны мутаций, ведущих к потере ферментативной активности или к изменению структуры синтезируемого белка. По данным [22], хроническое облучение с

Таблица 2. Частоты аллелей трех локусов SOD

Вариант	Локусы	Аллели	Частота
Контроль	SOD-1	1.10	0
		1.00	1
		<i>n</i>	0
	SOD-2	1.00	1
		<i>n</i>	0
	SOD-3	1.00	1
<i>n</i>		0	
ВИУА	SOD-1	1.10	0
		1.00	$0.994 \pm 0.006$
		<i>n</i>	$0.006 \pm 0.006$
	SOD-2	1.00	1
		<i>n</i>	0
	SOD-3	1.00	1
<i>n</i>		0	
СБ	SOD-1	1.10	0
		1.00	$0.986 \pm 0.008$
		<i>n</i>	$0.014 \pm 0.008$
	SOD-2	1.00	1
		<i>n</i>	0
	SOD-3	1.00	1
<i>n</i>		0	
ЗК	SOD-1	1.10	$0.200 \pm 0.027^*$
		1.00	$0.756 \pm 0.029^*$
		<i>n</i>	$0.044 \pm 0.014^*$
	SOD-2	1.00	$0.987 \pm 0.008$
		<i>n</i>	$0.013 \pm 0.008$
	SOD-3	1.00	$0.996 \pm 0.004$
<i>n</i>		$0.004 \pm 0.004$	
ЗП	SOD-1	1.10	$0.271 \pm 0.003^{**}$
		1.00	$0.676 \pm 0.031^{**}$
		<i>n</i>	$0.053 \pm 0.015^*$
	SOD-2	1.00	$0.987 \pm 0.008$
		<i>n</i>	$0.013 \pm 0.008$
	SOD-3	1.00	$0.991 \pm 0.006$
<i>n</i>		$0.009 \pm 0.006$	

\* Различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .

\*\* Различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0.01$ .

Таблица 3. Частоты разных типов мутаций в эндоспермах семян

Вариант	Локусы	Число проведенных локус-тестов	Частота нуль-мутаций	Частота - дупликаций	Частота изменений подвижности
Контроль	SOD-1	240	0	0	0
	SOD-2	240	0	0	0
	SOD-3	240	0	0	0
ВИУА	SOD-1	180	0.055 ± 0.055	0	0
	SOD-2	180	0	0	0
	SOD-3	180	0	0	0
СБ	SOD-1	210	0.014 ± 0.008	0.005 ± 0.005	0
	SOD-2	210	0	0	0
	SOD-3	210	0	0	0
ЗК	SOD-1	225	0.044 ± 0.014*	0.009 ± 0.007	0.022 ± 0.01
	SOD-2	225	0.013 ± 0.008	0.004 ± 0.004	0.009 ± 0.006
	SOD-3	225	0.004 ± 0.004	0	0
ЗП	SOD-1	225	0.050 ± 0.015*	0.013 ± 0.008	0.013 ± 0.008
	SOD-2	225	0.009 ± 0.006	0.013 ± 0.008	0.009 ± 0.006
	SOD-3	225	0.009 ± 0.007	0	0

\* Различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .

мощностью дозы  $0.2 \times 10^{-4}$  Гр/сут, которая в 100 раз меньше принятой за безопасную для сосны на основе анализа соматических эффектов [23], индуцирует мутации в аллозимных локусах с частотой, превышающей контрольный уровень в 3.6 раза. Следует также отметить, что при пере-

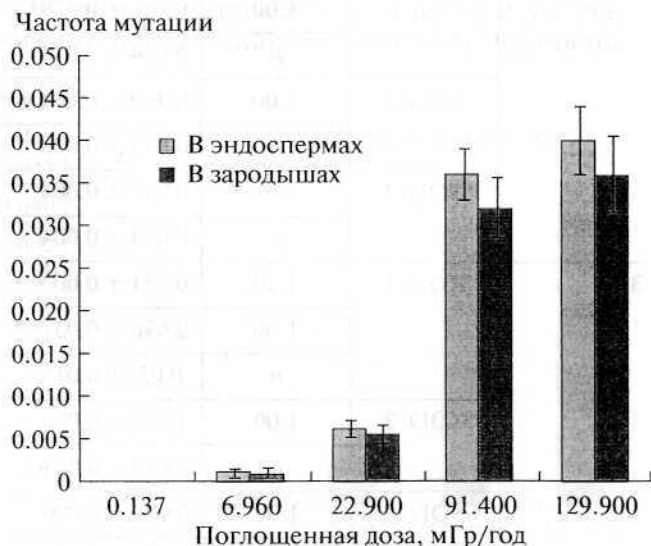


Рис. 5. Сопоставление частоты мутаций в локусах кодирующих SOD генов в материнских гаметах и зародышах семян исследуемых популяций.

счете на единицу поглощенной дозы наблюдается повышенная генетическая эффективность низких мощностей доз по сравнению с более высокими [4, 21]. Это явление необходимо учитывать при оценке риска хронического облучения популяций человека, животных и растений.

Метод изоферментного анализа позволяет оценить частоту мутационных событий в кодирующих конкретный фермент генах. Частота нуль-мутаций кодирующих SOD генов достоверно превышает контрольный уровень и растет вместе с дозой, поглощенной генеративными органами растений (рис. 4). Аналогичная ситуация наблюдается и для общего числа мутаций с учетом изменения электрофоретической подвижности и дупликаций (рис. 3). Интересно, что при анализе частоты мутаций в 20 ферментных локусах сосны урожая 1986 г. из пяти популяций, населяющих контрастные по уровню радиоактивного загрязнения участки 30-километровой зоны ЧАЭС, не было отмечено ни одного мутационного события в кодирующих супероксиддисмутазу локусах [18]. Частота мутаций в других исследованных локусах изменялась в пределах  $(1.8-6.8) \times 10^{-3}$ . Трудно объяснить, почему в облученных высокими дозами (0.5–10 Гр) сосновых деревьях и при использовании достаточного количества локус-тестов (2832 для SOD) авторы не обнаружили ни одной мутации. Тем более, что, согласно [20], даже в по-



Рис. 6. Фенотипическое разнообразие популяций сосны обыкновенной по локусам SOD.

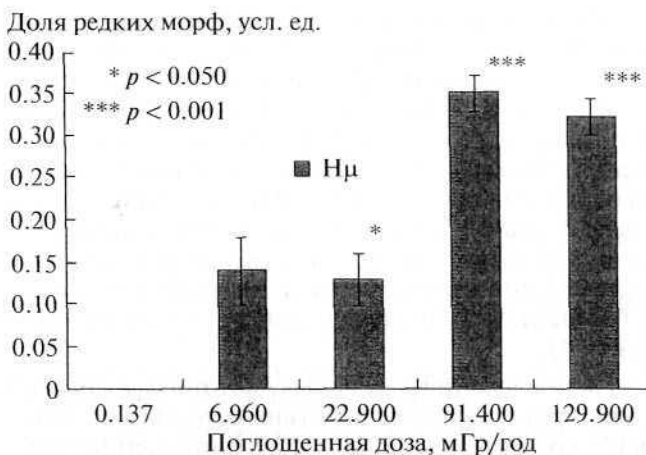


Рис. 7. Доля редких морф в популяциях сосны обыкновенной.

пуляциях сосны, не испытывающих техногенное воздействие, мутации в этом локусе происходят с частотой  $0.33 \times 10^{-3}$ .

При анализе изоферментного полиморфизма есть возможность учитывать имеющие разное происхождение мутации. Если мутация индуцирована в материнской клетке мегаспоры, при мейозе она может перейти в архигониальную клетку. Такая мутация проявится и в эндосперме, и в зародыше. Если же мутация индуцирована в мегаспоре, которая дает начало многоядерному эндосперму, то она будет обнаружена только в эндосперме. С другой стороны, при анализе зародыша регистрируются как индуцированные в материнских гаметах мутации, так и привнесенные пылью. Именно поэтому, даже при наличии сильного отбора против спонтанно возникающих редких аллельных вариантов [20], в разных экологических ситуациях при анализе разных наборов генов наблюдаются разные соотношения между частотой мутаций в материнских гаметах и зародышах. Так, при сопоставлении частоты мутаций в локусах *Got-2* и *Got-3* в эндоспермах и зародышах семян сосны из 30-километровой зоны ЧАЭС было обнаружено [24], что частота мутаций в зародышах несколько превышает или равна зарегистрированной при анализе эндоспермов. Добавление в анализ еще одного локуса (*Got-1*) и увеличение числа проанализированных локус-тестов привело тех же авторов [21] к выводу о наличии сильного отбора против редких электрофоретических вариантов белков в условиях острого и хронического облучения. В нашем исследовании не было обнаружено (рис. 5) достоверного превышения частоты мутаций в материнских гаметах по сравнению с зародышами.

Частота aberrантных клеток в корневой меристеме проростков семян из тех же самых популя-

ций сосны достоверно превышает контрольный уровень на протяжении всех лет нашего исследования (2003–2010) [11]. Чтобы понять, почему устойчивое увеличение частоты цитогенетических нарушений и мутаций изоферментных локусов наблюдается в популяциях сосны начиная со столь низких мощностей дозы (0.8 мГр/ч), необходимо вспомнить, что в первый год после аварии эти популяции подверглись облучению в гораздо более высоких дозах, основной вклад в формирование которых внесли короткоживущие радионуклиды [13, 25]. Хорошо известна [26] способность растений сохранять память о пережитом стрессе и передавать эту информацию следующим поколениям. В настоящее время наших знаний недостаточно, чтобы понять в деталях механизмы, лежащие в основе этого феномена. Тем не менее, известно [26–28], что в ходе этого процесса изменяется экспрессия многих генов, а контроль его осуществляется на эпигенетическом уровне.

Воздействие техногенных факторов ведет к включению в генный пул новых аллельных форм

Таблица 4. Эффективное число аллелей

Вариант	Локус	$n_e$
Контроль	SOD-1	1
ЗК	SOD-1	$1.64^* \pm 0.2$
ЗП	SOD-1	$1.9^{**} \pm 0.08$

\* Различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .  
 \*\* Различия значимы по сравнению с контролем,  $p < 0.01$ .



и изменению генетической структуры популяции. Однако изменения происходят, как правило, не за счет закрепления новых аллелей, большинство которых элиминируются на ранних стадиях онтогенеза [20], а главным образом связаны с изменением вероятности выживания как нормальных, так и мутантных генотипов в изменившейся среде обитания [29]. Это ведет к изменению генетической структуры хронически облучаемых популяций, что находит отражение в увеличении гетерозиготности и эффективного числа аллелей (табл. 4).

Распределение аллельных частот в популяциях является результатом действия естественного отбора, который в течение многих поколений регулировал частоту спонтанно возникающих мутантных аллелей. Наблюдаемый в популяциях биохимический полиморфизм не является нейтральным и связан с ролью ферментов в механизмах нейтрализации поллютантов или токсичных продуктов их опосредованного действия, т.е. разные аллели полиморфных локусов могут по-разному влиять на приспособленность к определенным условиям существования [30, 31]. Частота мутаций, обладающих селективным преимуществом в определенных условиях, увеличивается и они распространяются в популяции. Действительно, в популяциях василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.), 12 лет развивавшихся в условиях хронического облучения на территории ВУРС, выявлено [31] достоверное увеличение частоты встречаемости аллеля S, кодирующего изофермент SOD, с повышенной эффективностью устраняющий активные формы кислорода.

Внутрипопуляционное разнообразие по локусу SOD в населяющих два участка с максимальным уровнем радиоактивного загрязнения популяциях сосны превышает контрольный уровень (рис. 6), а доля редких морф достоверно увеличивается вместе с поглощенной генеративными органами растений дозой (рис. 7). Однако существуют и противоположные примеры. При исследовании аллозимной структуры популяций одуванчика лекарственного по берегам реки Теча на Южном Урале индексы внутрипопуляционного разнообразия фоновой и экспериментальной популяций значимо не различались [32], несмотря на сопоставимые с нашим исследованием дозы. Это может быть связано со значительно меньшей, чем у одуванчика, радиорезистентностью голосеменных растений вообще и сосны обыкновенной в частности. Поэтому для увеличения внутрипопуляционного разнообразия в популяциях одуванчика лекарственного нужны гораздо более высокие дозы, чем формирующие аналогичный эффект в популяциях сосны. Действительно, при исследовании теми же авторами аллозимной структуры в популяциях одуванчика с территории ВУРС, где растения получали гораздо

более высокие дозы, было показано [33], что средние популяционные значения индекса Животовского превышают фоновые. Вместе с тем, высокие уровни техногенного воздействия, ведущие к гибели наиболее чувствительных особей, снижают внутрипопуляционное разнообразие [19]. Таким образом, степень генетического разнообразия в популяциях растений, населяющих загрязненные участки, в значительной степени определяется видовой чувствительностью, интенсивностью и природой техногенного воздействия. В целом же полученные в нашем исследовании результаты подтверждают сделанный ранее вывод [34], что одной из важнейших реакций популяции на стрессовые воздействия является увеличение генетической и фенотипической изменчивости.

Сравнение частотных соотношений аллельных вариантов в контрольной и хронически облучаемых популяциях свидетельствует о сдвигах в их распределении, которые могут быть связаны с изменением приспособленности генотипов. Подтверждающие это утверждение данные были получены [9, 31] в опытах на популяциях василька шероховатого, несколько десятилетий обитающих в условиях хронического облучения на Восточно-Уральском радиоактивном следе. Полиморфизм SOD в исследованных нами популяциях увеличивается вместе с уровнем радиоактивного загрязнения (рис. 6, 7). Техногенное воздействие часто сопровождается развитием оксидативного стресса [35], причем в разных компартментах клетки уровни реактивных форм кислорода могут значительно различаться. Это влечет за собой экспрессию генов, кодирующих определенные SOD-изоформы, необходимые для защиты специфических клеточных компартментов. В условиях хронического радиационного воздействия роль аллозимов SOD как ферментов, элиминирующих супероксидный радикал, существенно возрастает. Так, увеличение в 2–5 раз радиостойкости семян ольхи кустарниковой, населяющей участки с повышенным естественным радиационным фоном, авторы работы [36] связывают с повышением активности SOD. Таким образом, наблюдаемый нами полиморфизм в генетических локусах, кодирующих супероксиддисмутазу, может быть обусловлен ключевой ролью этого фермента в ликвидации активных форм кислорода, как это было показано в [31, 37]. Возникновение редких аллелей SOD в популяции и увеличение их частоты может трактоваться как процесс, направленный на получение отдельными особями эволюционного преимущества в условиях индуцированного хроническим облучением оксидативного стресса.

Из представленных результатов следует, что даже относительно невысокие уровни хронического облучения (7–130 мГр/год) способны ока-

зывать мутагенное воздействие и изменять генетическую структуру популяций сосны обыкновенной. В хронически облучаемых популяциях сосны формируется потомство с высоким уровнем мутационной изменчивости, значимо превышающим контрольные показатели. Увеличение радиоактивного загрязнения участков до 39 кБк/кг ведет к достоверному росту частоты мутаций изоферментных локусов, эффективного числа аллелей, внутривидового разнообразия и частоты редких морф. Изменение генетической структуры исследованных популяций происходит за счет увеличения частоты встречаемости редких аллелей.

Авторы выражают благодарность Н.И. Санжаровой и двум анонимным рецензентам, конструктивные рекомендации которых способствовали улучшению качества представления материала.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 11-04-00670 и 11-04-97524).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bradshaw A.D. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1991. V. 33. P. 289–305.
2. Fisher R.A. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford: Clarendon Press, 1930. 145 p.
3. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
4. Шевченко В.А., Печуренков В.Л., Абрамов В.И. Радиационная генетика природных популяций. М.: Наука, 1992. 221 с.
5. Galbraith H., LeJeune K., Lipton J. // Environ. Toxicol. Chem. 1995. V. 11. P. 1895–1908.
6. Tikhomirov F.A., Shcheglov A.I. // Sci. Total Environ. 1994. V. 157. P. 45–57
7. Козубов Г.М., Таскаев А.И. Радиобиологические и радиэкологические исследования древесных растений. СПб: Наука, 1994. 256 с.
8. Карабань Р.Т., Мишенков Н.Н., Пристер Б.С. и др. // Проблемы лесной радиэкологии. Тр. ИПГ. Вып. 38. М.: Гидрометеиздат, 1979. С. 27–52.
9. Кальченко В.А., Калабушкин В.А., Рубанович А.В. // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 676–684.
10. Гераськин С.А., Ванина Ю.С., Дикарев В.Г. и др. // Радиационная биология. Радиэкология. 2009. Т. 49. № 2. С. 136–146.
11. Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Dikareva N.S. et al. // Ecotoxicology. 2011. V. 20. P. 1195–1208.
12. Sparrow A.H., Rogers A.F., Schwemmer S.S. // Radiat. Botany. 1968. V. 8. P. 149–186.
13. Ramzaev V., Botter-Jensen L., Thompsen K.J. et al. // J. Environ. Radioactivity. 2008. V. 99. P. 1154–1164.
14. Гераськин С.А., Дикарева Н.С., Удалова А.А. и др. // Радиационная биология. Радиэкология. 2008. Т. 48. № 5. С. 584–595.
15. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, 1994.
16. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
17. Спиридонов С.И., Фесенко С.В., Гераськин С.А. и др. // Радиационная биология. Радиэкология. 2008. Т. 48. № 4. С. 432–438.
18. Кальченко В.А., Архипов Н.П., Федотов И.С. // Генетика. 1993. Т. 29. № 2. С. 266–272.
19. Духарев В.А., Коршиков И.И., Рябоконе С.М. // Цитология и генетика. 1992. Т. 26. № 3. С. 7–11.
20. Алтухов Ю.П., Духарев В.А., Животовский Л.А. // Генетика. 1983. Т. 19. № 2. С. 264–275.
21. Федотов И.С., Кальченко В.А. // Радиационная биология. Радиэкология. 2006. Т. 46. № 3. С. 268–278.
22. Кальченко В.А., Спиридонов С.И. // Генетика. 1989. Т. 25. № 6. С. 1059–1064.
23. Sparrow A.H. // Radiat. Bot. 1966. V. 6. № 5. P. 9–26.
24. Кальченко В.А., Рубанович А.В., Федотов И.С. и др. // Генетика. 1993. Т. 29. № 7. С. 1205–1212.
25. Ипатьев В.А., Багинский В.Ф., Булавик И.М. и др. Лес. Человек. Чернобыль. Лесные экосистемы после аварии на Чернобыльской АЭС: Состояние, прогноз, реакция населения, пути реабилитации. Минск: Ин-т леса НАН Беларуси, 1999. 451 с.
26. Molinier J., Ries G., Zipfel C. et al. // Nature. 2006. V. 442. P. 1046–1049.
27. Bruce T.J.A., Matthes M.C., Napier J.A. et al. // Plant Sci. 2007. V. 173. P. 603–608.
28. Kovalchuk O., Burke P., Arkhipov A. et al. // Mutat. Res. 2003. V. 529. P. 13–20.
29. Глазко Т.Т., Архипов Н.П., Глазко В.И. Популяционно-генетические последствия экологических катастроф на примере Чернобыльской аварии. М.: ФГОУ ВПО РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2008. 556 с.
30. Алтухов Ю.П., Дуброва Ю.Е. // Успехи современной биологии. 1981. Т. 91. № 3. С. 467–480.
31. Кальченко В.А., Рубанович А.В., Шевченко В.А. // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1509–1512.
32. Ульянова Е.В., Позолотина В.Н., Сарапульцев И.Е. // Экология. 2004. № 5. С. 349–357.
33. Антонова Е.В., Позолотина В.Н. // Экология. 2007. № 5. С. 355–361.
34. Гераськин С.А., Удалова А.А., Дикарева Н.С. и др. // Радиационная биология. Радиэкология. 2010. Т. 50. № 4. С. 374–382.
35. Inze D., Van Montagu M. // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. V. 6. P. 153–158.
36. Журавская А.Н., Кершенгольц Б.М., Курилюк Т.Т. // Радиационная биология. Радиэкология. 1995. Т. 35. Вып. 3. С. 349–355.
37. Tong P., Moya A., Ayala F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1968. V. 83. P. 684–687.

Поступила в редакцию  
17.01.2012