

РАДИАЦИОННАЯ
ГЕНЕТИКА

УДК 575.22:582.475.4:621.039.586

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПОПУЛЯЦИЯХ СОСНЫ
ОБЫКНОВЕННОЙ ИЗ РАЙОНОВ БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ,
ПОДВЕРГШИХСЯ РАДИОАКТИВНОМУ ЗАГРЯЗНЕНИЮ
В РЕЗУЛЬТАТЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС**

© 2009 г. С. А. Гераскин*, Ю. С. Ванина, В. Г. Дикарев, Т. А. Новикова,
А. А. Удалова, С. И. Спиридонов

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии РАСХН, Обнинск

Метод изоферментного анализа мегагаметофитов использован для оценки генетической изменчивости в популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), населяющих контрастные по уровню радиоактивного загрязнения (удельные активности ^{137}Cs в почве – 60–17800 Бк/кг) участки в Брянской области, подвергшейся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Значения всех использованных показателей генетической изменчивости (гетерозиготность, частота полиморфных локусов, индекс Животовского) и частоты приводящих к потере ферментативной активности мутаций достоверно увеличиваются с дозой, поглощенной критическими органами растений. Из представленных данных следует, что в исследованных популяциях сосны обыкновенной формируется семенное потомство с высоким уровнем мутационной изменчивости, а генетическая дифференциация сравниваемых популяций в значительной степени обусловлена радиационным воздействием.

Авария на Чернобыльской АЭС, сосна обыкновенная, изоферменты, полиморфизм, гетерозиготность, фенотипическое разнообразие, сегрегация, нуль-мутации.

Генофонд природных популяций непрерывно изменяется в направлении состояния, обеспечивающего наибольшую приспособленность к условиям окружающей среды в данный момент времени. Способность популяции адаптироваться к меняющимся условиям среды зависит, в частности, от величины генетического полиморфизма признаков, по которым идет отбор [1, 2]. Хроническое стрессовое воздействие может менять величину либо структуру внутривидовой изменчивости [3–9]. Поэтому анализ их взаимосвязей является перспективным с точки зрения разработки новых методов индикации состояния окружающей среды. Кроме того он вносит существенный вклад в понимание генетических основ дивергенции и адаптации природных популяций в современных условиях.

С появлением электрофоретических методов анализа, позволяющих установить число и частоту аллельных вариантов ферментов, участвующих в формировании генетической изменчивости по каждому из изученных локусов, а также соотношение гомозигот и гетерозигот, открылась возможность количественной оценки генетической изменчивости и дифференциации популя-

ций, 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 [10–13].

Расширение масштабов использования ионизирующих излучений и радионуклидов в разных сферах человеческой деятельности делает актуальной оценку экологических последствий радиоактивного загрязнения окружающей среды. Последствия техногенного загрязнения реализуются на популяционном уровне, поэтому особый интерес представляет анализ биологических и генетических эффектов в популяциях растений и животных, населяющих загрязненные радионуклидами территории. В многолетних исследованиях В.А. Кальченко с соавт., выполненных на Восточно-Уральском радиоактивном следе (ВУРС) [14] и в 30-километровой зоне Чернобыльской АЭС [12], было показано, что в популяциях рас-

* Адресат для корреспонденции: 249020 Обнинск, Калужская обл., Киевское ш., 109 км, ВНИИСХРАЭ; тел.: (48439) 9-69-64; факс: (48439) 6-80-66; e-mail: stgeraskin@gmail.com.

тений, 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 о том, какие генетические процессы происходят в популяциях, населяющих территории с относительно низким уровнем радиоактивного загрязнения. Конкретные микроэволюционные механизмы адаптации популяций к изменившимся условиям среды также остаются не до конца изученными. Нет полного понимания того, как сказывается на репродуктивной способности, адаптивной дифференциации и в целом судьбе населяющих такие территории популяций характерные для этих условий повышенные частоты генетических и цитогенетических нарушений в соматических и половых клетках [15]. Нет ответа и на вопрос: почему в некоторых радиоэкологических условиях адаптация природных популяций к повышенным уровням радиоактивного загрязнения происходит быстро, буквально в течение нескольких поколений, в других же случаях признаки адаптации не обнаруживаются и спустя десятки лет?

Виды перекрестно опыляющихся древесных растений, представленные большими популяциями с высоким уровнем генотипической и фенотипической изменчивости и произрастающие в разнообразных экологических условиях, являются удобным объектом для изучения молекулярно-генетических механизмов адаптации. В последние годы хвойные растения стали особенно популярны в качестве тест-объектов популяционно-генетических исследований [14, 16].

Цель настоящей работы – анализ изоферментного полиморфизма 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 лесобразующий вид Северной Евразии. В природных сообществах сосна относится к эдификаторным видам, определяющим лицо фитоценоза и в существенной степени влияющим на жизнь других растений. Данные о высокой радиочувствительности хвойных растений были получены в начале 1960-х годов в Брукхейвенской лаборатории США [17] и подтверждены в ходе масштабного эксперимента “Экос” на Южном Урале [18]. Наиболее чувствительны к повреждающим воздействиям репродуктивные органы хвойных растений, отличающиеся сложностью организации и длительностью

генеративного цикла [19]. 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. Контрастные по уровню радиоактивного загрязнения (2950–17800 Бк/кг по ^{137}Cs) экспериментальные участки находились на территории Новозыбковского, Клинцовского и Красногорского районов Брянской области (табл. 1), подвергшихся загрязнению радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Их выбирали с учетом гомогенности древостоя и достаточно высокого представительства (не менее 70%) сосновых деревьев в фитоценозе, однородности по почвенно-климатическим условиям, агрохимическим свойствам почв и уровню техногенного загрязнения. Контрольный участок был расположен в Выгоничском районе Брянской области. Активность ^{137}Cs в почве контрольного участка не превышала 60 Бк/кг, мощность экспозиционной дозы (МЭД) менялась в пределах 0.43–0.94 пА/кг. Детальное описание экспериментальных участков, уровней их техногенного и радиоактивного загрязнения представлено в [20].

Отбор проб для исследования. На экспериментальных участках были отобраны пробы почвы и биологического материала (шишки) для определения уровней загрязнения радионуклидами и химическими элементами, а также проведения изоферментного анализа. На каждом участке шишки отбирали с 15–20 деревьев 20–50-летнего возраста в пределах гомогенного древостоя, по 30–50 штук с каждого дерева на высоте 1.5–2.0 метра от поверхности земли. Сбор проводили в конце ноября – начале декабря 2005 г. Для дозревания и стратификации шишки выдерживали вне помещения до конца февраля. Затем их подсушивали при пониженной влажности и комнатной температуре до раскрытия и высыпания семян, которые обескрыливали вручную. Для электрофоретического анализа использовали только свободно высыпавшиеся, хорошо выполненные семена.

Изоферментный анализ. Исследовали пять ферментных систем (табл. 2). Ферменты экстрагировали из эндоспермов семян, по 11–32 эндосперма с дерева (в среднем по 15). Каждый эндосперм гомогенизировали в 75 мкл экстрагирующего буфера (1%-ный раствор тритона X-100 и 0.2%-ный раствор β -меркаптоэтанола). Разделение экстрактов проводили в вертикальных пластинках 7.5%-ного полиакриламидного геля в трис-HCl буфере с pH 8.9 на установке “P9DS-2” (Owl, США). В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер с pH 8.3. Время электрофореза составляло 1.5–3 ч при си-

Таблица 1. Характеристика экспериментальных участков

Участок	Описание участка	МЭД, пА/кг	¹³⁷ Cs в почве, Бк/кг	D ₂₀₀₃ , мГр	D _{1986–2008} , мГр
К	Контрольный участок, расположен в 4 км от пос. Алексеевский (Выгоничский район Брянской области) с левой стороны (в направлении от Брянска) федеральной автодороги М3 (Киевское шоссе). Представляет собой опушку смешанного леса с преобладанием сосны возрастом 50–60 лет и вырубку, заросшую соснами 15–20-летнего возраста	0.43–0.94	59.8 ± 7.6	0.13	3.4
ВИУА	Участок расположен у дороги местного значения, ведущей от пос. ВИУА в пос. Перевоз. Представляет собой опушку смешанного леса с преобладанием сосны возрастом 50–80 лет	3.6–5.0	2950 ± 322	7.4	190
СБ	Участок расположен вдоль лесной дороги в 7 км от пос. Старые Бобовичи. Представляет собой смешанный лес с преобладанием сосны возрастом 20–60 лет	8.6–10.1	4030 ± 439	15.3	390
ЗП	Участок расположен вдоль опушки соснового леса в 2–4 км от д. Заборье. Представляет собой опушку соснового леса, деревья возрастом 20–30 лет растут на месте прошлых лесозаготовительных работ	12.9–15.8	17 100 ± 1864	28.3	720
ЗК	Участок расположен вдоль опушки соснового леса в 1–2 км от д. Заборье в 50 м от кладбища. Представляет собой опушку соснового леса, деревья возрастом 20–30 лет	18.0–25.2	17 800 ± 1940	37.8	970

Примечание. МЭД – мощность экспозиционной дозы; D₂₀₀₃ – поглощенная доза в генеративных органах сосны в 2003 г.; D_{1986–2008} – поглощенная доза, накопленная за период 1986–2008 гг.

ле тока 40 мА. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности осуществляли по методике [21] с модификациями.

Идентификацию аллозимов проводили по их относительной подвижности. Наиболее часто встречающийся аллозим и соответствующий ему аллель локуса обозначали цифровым символом 1.00. Остальные аллозимы этого локуса обозначали в соответствии с их электрофоретической подвижностью относительно аллозима 1.00. Варианты с отсутствием ферментативной активности обозначали буквой *n*. Для исследования сегрегации аллели расшифровывали как быстрый (F) и медленный (S); варианты с отсутствием ферментативной активности не учитывали. Всего было выполнено 4945 локус-тестов.

Таблица 2. Ферменты, их аббревиатура, кодовый номер и число локусов

Фермент	Кодовый номер	Число локусов
Глутаматдегидрогеназа (GDH)	1.4.1.2	1
Лейцинаминопептидаза (LAP)	3.4.11.1	2
Малатдегидрогеназа (MDH)	1.1.1.37	4
Диафораза (DIA)	1.6.99	2
6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD)	1.1.1.44	1

Статистический анализ экспериментальных данных. Для каждой популяции рассчитывали частоты аллелей и ряд показателей, характеризующих генетическую изменчивость в популяциях сосны обыкновенной. Ожидаемую гетерозиготность (H_e) по каждому локусу оценивали по формуле $H_e = \frac{2N}{2N-1} (1 - \sum_i p_i^2)$ [22], где p_i – частота i -го аллеля, N – число аллелей. Наблюдаемую гетерозиготность (H_o) вычисляли путем деления числа гетерозиготных деревьев на общее количество проанализированных по данному локусу деревьев. Показатель полиморфности (P_{95}) рассчитывали путем деления числа полиморфных локусов на общее количество исследованных локусов; при этом локус считали полиморфным, если частота наиболее часто встречающегося аллеля не превышала 95%. Индекс внутривидового разнообразия Животовского (μ) оценивали по формуле $\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2$ [22]. Достоверность различий по частоте встречаемости аллелей между контрольной и экспериментальными популяциями оценивали с помощью модифицированного χ^2 -критерия, рекомендованного [22] для случая небольших объемов выборок и наличия редких фенотипов в популяции. Статистика критерия и число степеней свободы рассчитываются как $\chi_G^2 = c\chi^2$; $v_G = cv$, где c – поправка, учитывающая малость ожидаемых численностей не-

которых аллелей [22]. Отклонение от ожидаемой сегрегации оценивали по χ^2 -тесту. Для определения значимости различий между средними значениями использовали критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Техногенное загрязнение экспериментальных участков. Почвы всех экспериментальных участков близки по агрохимическим свойствам, а содержание в них доступных растениям подвижных форм тяжелых металлов находится ниже допустимых пределов [20]. Качественно иная картина имеет место в отношении радиоактивного загрязнения экспериментальных участков, основной вклад в которое вносит ^{137}Cs – ведущий дозообразующий радионуклид на загрязненных в результате аварии на Чернобыльской АЭС территориях. Удельная активность этого радионуклида на наиболее загрязненном участке ЗК в 300 раз выше, чем на контрольном (табл. 1). Содержание ^{137}Cs в почве участков ЗП и ЗК превышает установленную нормами радиационной безопасности [23] минимально значимую удельную активность для этого радионуклида.

Для оценки дозовых нагрузок на генеративные органы сосновых деревьев была разработана дозиметрическая модель [24]. Результаты расчета поглощенных доз, формируемых γ - и β -излучением ^{137}Cs , приведены в табл. 1. К моменту начала исследований экспериментальные популяции сосны обыкновенной почти 20 лет росли в условиях хронического облучения малой мощности. Согласно нашим оценкам, за период с 1986 по 2008 гг. накопленная в кронах деревьев экспериментальных участков доза составила 0.2–1.0 Гр, что находится в хорошем соответствии с результатами независимого исследования [25], выполненного в непосредственной близости от одного из наших экспериментальных участков. Дозовая нагрузка на генеративные органы сосновых деревьев на максимально загрязненном экспериментальном участке (ЗК) в 2003 г. достигала 37.8 мГр/год. Вклад β -излучения в суммарную мощность дозы на всех экспериментальных участках составлял приблизительно 10%. Наибольший вклад в формирование дозы на генеративные органы сосны вносит ^{137}Cs , содержащийся в верхнем 10-см слое почвы. Находящиеся в кронах радионуклиды оказывают меньшее воздействие. При этом поглощенная в генеративных органах сосны доза от распределенных в пологе леса радионуклидов формируется главным образом за счет β -излучения.

Аллозимная изменчивость в популяциях сосны обыкновенной. Для оценки генетической изменчивости в популяциях сосны обыкновенной проводили электрофоретический анализ пяти ферментных систем, в ходе которого выявлено 33

разных электрофоретических варианта. Расположение вариантов на гелях представлено на рис. 1.

На окрашенных для выявления GDH гелях наблюдается одна зона ферментативной активности, что свидетельствует о моногенном контроле этого фермента. Обнаружены четыре варианта фермента с разной подвижностью, включая нуль-аллель. У LAP на электрофореграммах выявлены две зоны активности. Более подвижная зона *Lap-1* и менее подвижная зона *Lap-2* представлены четырьмя аллозимными вариантами, в том числе и нуль-аллелем. У MDH обнаружили четыре зоны активности. Каждая зона представлена двумя однополосными вариантами и нуль-аллелем. На окрашенных для выявления DIA электрофореграммах выявлены две зоны активности. Более подвижная зона – *Dia-1* представлена двумя однополосными вариантами и нуль-аллелем, а менее подвижная зона – *Dia-2* представлена одним однополосным вариантом и нуль-аллелем. При окрашивании электрофореграмм для выявления 6-PGD наблюдали одну полиморфную зону ферментативной активности, представленную четырьмя однополосными вариантами.

Всего идентифицировано 10 ферментных локусов, ответственных за аллозимное разнообразие в изученных популяциях *Pinus sylvestris* L.: *6-Pgd*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*, *Gdh*. Частоты каждого аллеля в исследованных популяциях представлены в табл. 3. Пять локусов обнаруживают изменчивость во всех обследованных популяциях (*6-Pgd*, *Lap-2*, *Dia-1*, *Mdh-3*, *Gdh*), локус *Lap-1* мономорфен в популяции СБ, *Dia-2* – в контрольной популяции и ЗК, *Mdh-2* и *Mdh-4* – в контрольной популяции, а локус *Mdh-1* обнаруживает изменчивость только в популяции ЗК.

Представленные в табл. 3 данные свидетельствуют о широком диапазоне изменчивости исследуемых ферментных систем в популяциях сосны обыкновенной. С увеличением плотности радиоактивного загрязнения уровень полиморфизма в популяциях возрастает с $P_{95} = 0.5$ в контроле до $P_{95} = 0.8$ в популяции ЗК (табл. 3); корреляция с поглощенной критическими органами растений дозой составила 90.8% ($p < 0.05$). Во всех популяциях сосны, подвергающихся радиационному воздействию, обнаружены достоверные различия с контролем частотных соотношений аллельных вариантов по одному или нескольким локусам (табл. 4).

Сегрегация аллозимных вариантов в эндоспермах сосны обыкновенной. Генетический контроль выявленных в процессе электрофореза вариантов ферментов определяли путем анализа их сегрегации среди эндоспермов семян гетерозиготных деревьев. В соответствии с законами Менделя, при моногенном наследовании у гете-

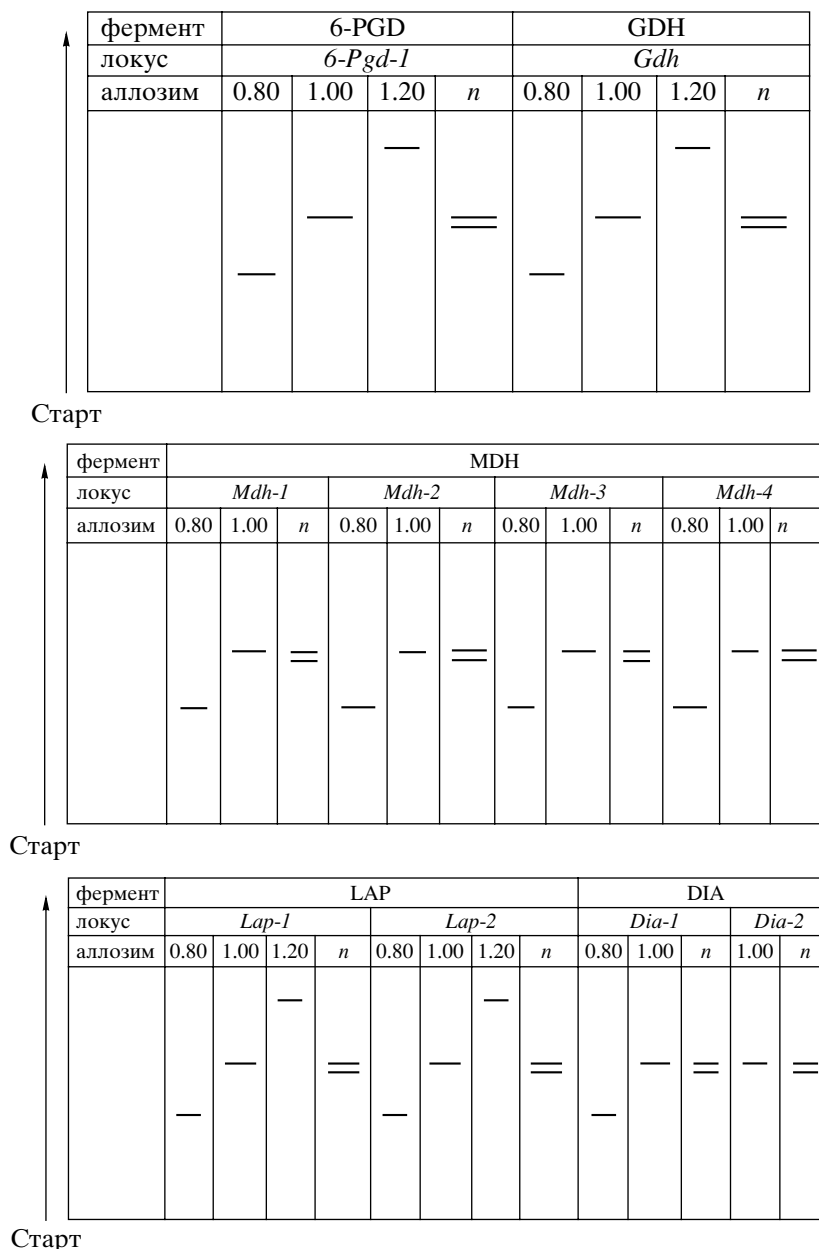


Рис. 1. Схематическое изображение электрофоретических вариантов 10 аллельных локусов *Pinus sylvestris* L.

розиготных по определенному локусу деревьев кодируемые аллелями этого локуса электрофоретические варианты (аллозимы) должны распределяться среди эндоспермов семян в соотношении 1:1. В табл. 5 приведены соотношения численностей быстрых (F) и медленных (S) аллелей в потомстве гетерозиготных сосен, а также значения статистики χ^2 , характеризующие отклонение от равномерного распределения.

В естественной среде обитания нарушения сегрегации в популяциях сосны обыкновенной наблюдаются довольно редко [26–28]. В нашем исследовании также не были выявлены случаи

достоверного отклонения от равномерной сегрегации в контрольной популяции (табл. 5), в то время как в популяциях, населяющих загрязненные радионуклидами участки, обнаружено нарушение сегрегации по некоторым локусам. Так, для локуса *6-Pgd* достоверное отклонение от менделевского расщепления аллелей имело место в трех экспериментальных популяциях сосны из четырех. Значительные отклонения от соотношения 1:1 отмечены для локуса *Mdh-3* в популяциях ВИУА и ЗК. Для фермента GDH статистически значимое отклонение от соотношения 1:1 имело место в популяции ЗП. Для локусов *Dia-1* и

Lap-2 значимых отклонений от менделевского расщепления аллелей не было выявлено.

Гетерозиготность. Динамика генетической структуры популяции в значительной степени определяется уровнем гетерозиготности. Оцененные по десяти локусам величины как наблюдаемой, так и ожидаемой гетерозиготности в исследованных популяциях *Pinus sylvestris* L. возрастают (рис. 2) вместе с уровнем радиоактивного загрязнения участков (корреляция с поглощенной критическими органами растений дозой составила 92.6 и 92.0% ($p < 0.05$) для H_o и H_e соответственно). Причем во всех экспериментальных популяциях как ожидаемая, так и наблюдаемая гетерозиготность достоверно выше, чем в контрольной ($p < 0.05$).

Внутрипопуляционное разнообразие. Внутрипопуляционное разнообразие оценивали с помощью индекса Животовского (среднее число аллелей в популяции с учетом их частоты). Все исследованные популяции сосны обыкновенной, произрастающие в условиях хронического радиационного воздействия, характеризуются достоверно превышающим контрольный уровень (рис. 3) внутрипопуляционным разнообразием, которое увеличивается вместе с поглощенной генеративными органами растений дозой ($r = 99.2\%$, $p < 0.001$).

Нуль-мутации. При изучении аллельных вариантов пяти ферментных систем в эндоспермах сосны обыкновенной из популяций, испытывающих хроническое радиационное воздействие, были обнаружены (табл. 3) нуль-мутации, которые идентифицировали как отсутствие на зимограмме соответствующего аллельного варианта. Нуль-мутация является следствием прекращения синтеза белка или потери им ферментативной активности. Обнаруженные нами аномальные типы наследования ферментных локусов представляют собой результат мутаций или рекомбинаций структурных генов в материнских гаметах. Другой причиной возникновения нуль-фенотипа может служить мутация, в результате которой один аллель превращается в другой. Имеются данные [29], что такого рода события связаны главным образом с делецией отдельных участков ДНК.

В контрольной популяции нуль-мутация была обнаружена только в одном локус-тесте (локус *Lap-1*) из 641 (табл. 3), в то время как во всех испытывающих радиационное воздействие популяциях нуль-мутации наблюдались в большинстве изученных локусов, причем их частота во многих случаях достоверно отличалась от нуля. Средняя по десяти локусам частота нуль-мутаций достоверно выше (рис. 4) в популяциях, населяющих участки, загрязненные радионуклидами, чем в контрольной. Хотя частота нуль-мутаций суще-

Таблица 3. Частоты аллелей в популяциях сосны обыкновенной, населяющих контрастные по уровню радиоактивного загрязнения участки в Брянской области

Локус	Аллель	Популяция				
		К	ВИУА	СБ	ЗП	ЗК
<i>6-Pgd</i>	1.20	0.033	0.095	0.064	0.085	0.082
	1.00	0.917	0.838	0.833	0.811	0.770
	0.80	0.050	0.029	0.090	0.057	0.049
	<i>n</i>	0.000	0.038	0.013	0.047	0.098
<i>Gdh</i>	1.20	0.063	0.000	0.081	0.058	0.099
	1.00	0.784	0.944	0.868	0.844	0.704
	0.80	0.153	0.049	0.036	0.097	0.148
	<i>n</i>	0.000	0.007	0.015	0.000	0.049
<i>Lap-1</i>	1.20	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000
	1.00	0.863	0.991	1.000	0.979	0.888
	0.80	0.063	0.000	0.000	0.000	0.063
	<i>n</i>	0.013	0.009	0.000	0.021	0.050
<i>Lap-2</i>	1.20	0.013	0.009	0.000	0.042	0.000
	1.00	0.988	0.982	0.935	0.917	0.975
	0.80	0.000	0.000	0.043	0.035	0.000
	<i>n</i>	0.000	0.009	0.022	0.007	0.025
<i>Dia-1</i>	1.20	0.174	0.073	0.060	0.170	0.200
	1.00	0.826	0.927	0.860	0.674	0.800
	0.80	0.000	0.000	0.080	0.133	0.000
	<i>n</i>	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000
<i>Dia-2</i>	1.00	1.000	0.967	0.990	0.985	1.000
	<i>n</i>	0.000	0.033	0.010	0.015	0.000
<i>Mdh-1</i>	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	0.917
	0.80	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
	<i>n</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050
<i>Mdh-2</i>	1.00	1.000	0.902	0.975	0.970	0.867
	0.80	0.000	0.088	0.013	0.030	0.100
	<i>n</i>	0.000	0.010	0.013	0.000	0.033
<i>Mdh-3</i>	1.00	0.886	0.833	0.911	0.861	0.683
	0.80	0.114	0.118	0.025	0.109	0.233
	<i>n</i>	0.000	0.049	0.063	0.030	0.083
<i>Mdh-4</i>	1.00	1.000	0.980	0.873	0.921	0.867
	0.80	0.000	0.000	0.089	0.030	0.117
	<i>n</i>	0.000	0.020	0.038	0.048	0.017
<i>P₉₅</i>		0.5	0.5	0.6	0.6	0.8

ственно варьирует как по разным локусам в пределах одной популяции, так и между популяциями, существует достоверная связь между поглощенной генеративными органами растений дозой и средней частотой нуль-мутаций в эндоспермах семян ($r = 88.9\%$, $p < 0.05$).

Таблица 4. Оценка достоверности отличий частотных соотношений аллельных вариантов от контроля

Локус	Популяция							
	ВИУА		СБ		ЗП		ЗК	
	χ_G^2	ν_G	χ_G^2	ν_G	χ_G^2	ν_G	χ_G^2	ν_G
<i>6-Pgd</i>	5.81	3.5	3.94	4.9	5.46	3.4	9.17*	3.5
<i>Gdh</i>	30.37***	4.8	17.11**	3.4	2.04	2.1	7.39	3.4
<i>Lap-1</i>	20.48***	4.2	16.45**	3.9	22.89***	3.6	8.04	3.6
<i>Lap-2</i>	2.61	6.8	14.97*	7.0	7.87	4.7	11.8	7.90
<i>Dia-1</i>	5.21*	1.0	11.35**	2.2	13.57*	3.4	0.15	1.0
<i>Dia-2</i>	2.71	1.2	9.91**	14.4	1.66	1.6	0	
<i>Mdh-1</i>	0		0		0		6.22	3.3
<i>Mdh-2</i>	7.07	3.1	6.42	11.4	1.37	1.0	9.07*	2.9
<i>Mdh-3</i>	2.45	2.2	7.66*	2.3	1.38	2.0	7.78*	2.2
<i>Mdh-4</i>	1.26	1.5	7.43*	2.5	3.74	2.0	13.59*	4.3

Примечание. Достоверное отличие от контроля: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. χ_G^2 , ν_G – значение статистики и числа степеней свободы модифицированного χ^2 -критерия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфность исследуемых популяций растет (табл. 3) вместе с уровнем радиоактивного загрязнения с 0.5 в контрольной популяции до 0.8 в популяции с наиболее загрязненного участка ЗК. Это значение превышает полученную в [30] суммарную оценку полиморфности для голосеменных (0.67). Внутрипопуляционное разнообразие всех экспериментальных популяций достоверно превышает (рис. 3) контрольный уровень и увеличивается вместе с плотностью радиоактивного

загрязнения участков. В противоположность нашим данным, при исследовании аллозимной структуры в популяциях одуванчика лекарственного (*Taraxacum vulgare* Schrank), населяющих пойму р. Теча на Южном Урале, индексы Животовского, рассчитанные для фоновой и импактных популяций, достоверно не различались [31]. В этой связи необходимо подчеркнуть, что хотя поглощенные растениями дозы в работе [31] и нашем исследовании были сопоставимы, чувствительность сосны к радиационному воздействию

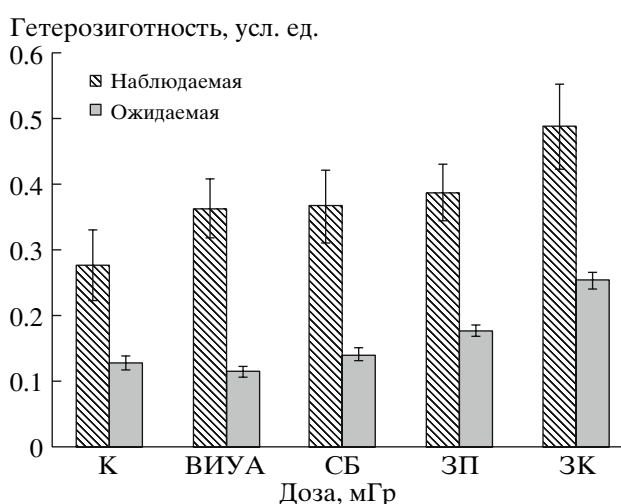


Рис. 2. Гетерозиготность в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (среднее по 10 локусам).

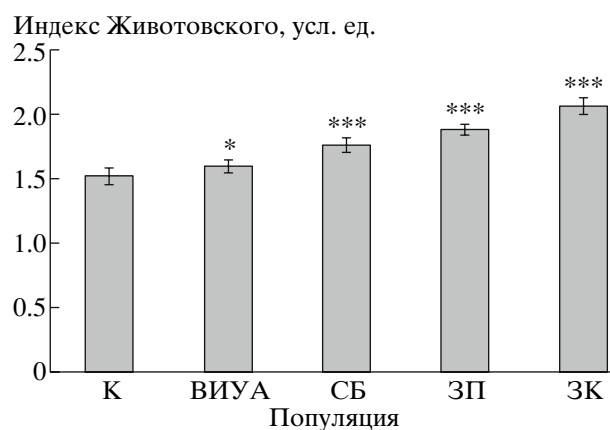


Рис. 3. Индекс фенотипического разнообразия в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (среднее по 10 локусам).

Достоверное отличие от контроля: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

значительно превышает таковую у одуванчика. Т.е. для увеличения внутривидового разнообразия в популяциях одуванчика нужны более высокие дозы, чем те, что формируют аналогичный эффект в популяциях сосны обыкновенной. Действительно, при исследовании теми же авторами аллозимной структуры в популяциях одуванчика с территории ВУРС, где растения получали гораздо более высокие дозы, было показано [32], что средние популяционные значения индекса Животовского в импактной популяции превышают фоновые. В то же время еще более высокие уровни техногенного воздействия, ведущие к гибели наиболее чувствительных особей, снижают внутривидовое разнообразие. Действительно, в зонах, где выживание растений детерминировано степенью их индивидуальной толерантности, отмечено [33] уменьшение генетического разнообразия. Таким образом, степень генетического разнообразия в популяциях растений, населяющих загрязненные участки, в значительной степени определяется видовой чувствительностью, силой и природой техногенного воздействия. В целом же полученные в нашем исследовании результаты подтверждают сделанный ранее [15] вывод, что одной из важнейших реакций популяции на стрессовые воздействия является увеличение генетической и фенотипической изменчивости. Возникает вопрос о биологическом смысле обнаруженного в нашем исследовании столь высокого уровня изменчивости и механизмах, ответственных за ее поддержание.

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. Частота мутаций, обладающих селективным преимуществом в определенных генотипических сочетаниях, увеличивается, и они распространяются в популяции. 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 (табл. 3 и 4). Данные, подтверждающие это утверждение, были получены Кальченко В.А. с соавт. [12] в опытах на популяциях василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.), 30 лет обитающих в условиях хронического облучения на ВУРС.

Резкие изменения среды обитания, помимо формирования новых экологических ниш, явля-

Таблица 5. Соотношение численностей быстрых (F) и медленных (S) аллелей в эндоспермах семян гетерозиготных деревьев

Локус	Популяция				
	К	ВИУА	СБ	ЗП	ЗК
<i>6-Pgd</i>	$\frac{29 : 16}{3.76}$	$\frac{36 : 65}{8.32^{**}}$	$\frac{43 : 18}{10.2^{**}}$	$\frac{28 : 42}{2.80}$	$\frac{30 : 10}{10.0^{**}}$
<i>Gdh</i>	$\frac{21 : 27}{0.75}$	–	$\frac{30 : 32}{0.07}$	$\frac{27 : 63}{14.4^{***}}$	$\frac{32 : 26}{0.62}$
<i>Lap-1</i>	–	–	–	–	–
<i>Lap-2</i>	$\frac{16 : 32}{5.33}$	–	–	$\frac{19 : 27}{1.39}$	–
<i>Dia-1</i>	$\frac{12 : 27}{5.77}$	–	$\frac{17 : 13}{0.53}$	$\frac{43 : 44}{0.01}$	–
<i>Dia-2</i>	–	–	–	–	–
<i>Mdh-1</i>	–	–	–	–	–
<i>Mdh-2</i>	–	–	–	–	–
<i>Mdh-3</i>	–	$\frac{46 : 12}{19.93^{***}}$	–	$\frac{22 : 18}{0.40}$	$\frac{41 : 14}{13.25^{***}}$
<i>Mdh-4</i>	–	–	–	–	–

Примечание. Над чертой соотношение численностей быстрых (F) и медленных (S) аллелей, под чертой значение χ^2 . Достоверное отличие от менделевского расщепления: ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$. Прочерками обозначены случаи, когда выявлено менее трех гетерозиготных деревьев по данному локусу.

ются пусковым механизмом экспрессии молчащей генетической информации. Именно увеличение возможностей фенотипического проявления

Частота нулевых аллелей

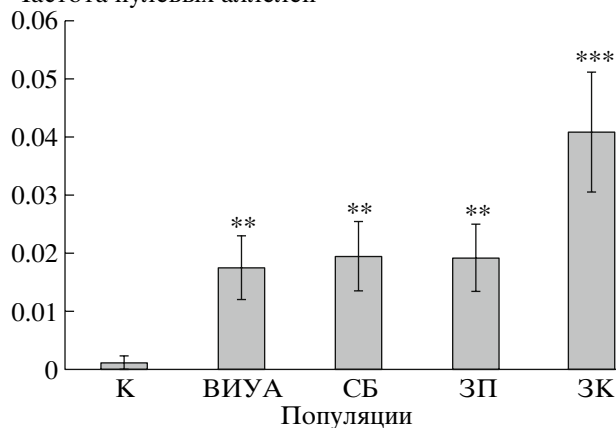


Рис. 4. Частота нулевых мутаций в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (среднее по 10 локусам).

Достоверное отличие от контроля: ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

скрытой ранее генетической изменчивости могло послужить одной из причин смены в ходе эволюции гаплоидной формы организации генома на диплоидную, способную в значительно больших масштабах [34] аккумулировать разнообразную генетическую изменчивость, не проявляя ее до поры в фенотипе. С этой точки зрения генетический груз в виде плейотропных рецессивных мутаций в диплоидном эукариотическом геноме способен играть определенную роль в биологической эволюции.

Обитающие в неблагоприятных условиях популяции (суровый климат, границы ареалов распространения видов, техногенное загрязнение) характеризуются не только большим полиморфизмом, но и повышенной гетерозиготностью по сравнению с популяциями, обитающими в оптимальных условиях [8, 35]. Совмещение двух и более вариантов одного фермента, а также гибридных гетерополимерных молекул мультимерных белков, которые превосходят оба типа гомомультимеров по биохимическим и физиологическим показателям, может придавать гетерозиготным особям большую пластичность в меняющейся среде [21, 36]. Имеются данные [8, 12, 14], что гетерозиготы лучше приспособлены к условиям экологического стресса. Средняя наблюдаемая гетерозиготность популяций сосны обыкновенной, населяющих участки, различающиеся степенью воздействия выбросов крупных химических предприятий, была выше ожидаемой и увеличивалась вместе с ростом техногенной нагрузки [33]. Для исследованных нами популяций также характерна (рис. 2) повышенная по сравнению с контролем гетерозиготность и превышение наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой, что может свидетельствовать о селективном преимуществе гетерозигот в условиях хронического облучения.

В то же время величина отклонения от равномерной сегрегации аллелей исследованных локусов в эндоспермах семян сосны обыкновенной не зависела (табл. 5) от уровня радиационного воздействия в исследованном диапазоне (7–40 МГр/год). Тенденция к увеличению отклонения от менделевского расщепления аллелей с увеличением дозы была обнаружена [14] при электрофорезе экстрактов эндоспермов семян сосны обыкновенной урожая 1986–1987 гг. из зоны аварии на Чернобыльской АЭС, при этом максимальное отклонение от равномерной сегрегации отмечалось при значительно больших, чем в нашем исследовании, дозах (1–5 Гр и выше).

Формой реального существования растений и животных в природе является популяция, поэтому разрабатываемые в настоящее время принципы радиационной защиты биоты должны основываться на ясном понимании генетических процес-

сов, которые индуцирует в популяциях хроническое радиационное воздействие. При этом принципиальное значение имеют два вопроса: каков мутагенный эффект хронического радиационного воздействия в низких дозах и какова судьба мутаций в условиях отбора в измененных экологических условиях? Прямым доказательством усиления темпов мутационного процесса в популяциях, населяющих загрязненные радионуклидами участки, является увеличение частоты редких электрофоретических вариантов, ведущих к потере белком ферментативной активности. Из результатов нашего исследования и исследований других авторов [14] следует, что радиоактивное загрязнение участков, на которых обитают изучаемые популяции сосны, может вносить существенный вклад в индукцию мутаций, ведущих к потере ферментативной активности. Оцененная нами частота нуль-мутаций полиморфных локусов сосны из контрольной популяции ($\sim 10^{-3}$) сходна с оценкой, полученной на гораздо более обширном экспериментальном материале (0.88×10^{-3}) [33]. Частота нуль-мутаций во всех популяциях, населяющих загрязненные радионуклидами участки, достоверно превышает (рис. 4) контрольный уровень и растет вместе с дозой, поглощенной генеративными органами растений. Из представленных результатов следует, что частота нуль-мутаций в природных популяциях является чувствительным и информативным критерием при оценке генетических последствий хронического облучения в малых дозах.

Частота aberrантных клеток в корневой меристеме проростков семян из тех же самых экспериментальных популяций сосны обыкновенной достоверно превышает контрольный уровень на протяжении всех лет исследования (2003–2005 гг. [20]; 2006–2007 гг., неопубликованные данные). Эти результаты, в совокупности с данными, представленными в настоящей работе, позволяют сделать вывод о том, что даже спустя 20 лет после аварии на Чернобыльской АЭС в исследованных популяциях сосны обыкновенной формируется семенное потомство с высоким уровнем мутационной изменчивости. Включенные в наш анализ гены кодируют синтез ключевых изоферментов, гомологи которых имеются [38] у других видов растений, животных и человека, что открывает возможность экстраполяции полученных результатов на другие биологические виды. Подобные исследования дают реальную основу для прогнозирования отдаленных популяционно-генетических последствий хронического облучения.

Метод электрофореза белков, дающий наиболее полное представление о генетическом полиморфизме популяций, позволил установить, что даже относительно невысокие уровни радиоактивного загрязнения (3–18 кБк/кг ^{137}Cs) способны оказывать воздействие на генетическое разнообразие

разии и изменять генетическую структуру популяций сосны обыкновенной. Значения всех использованных нами показателей генотипического разнообразия (гетерозиготность, частота полиморфных локусов, индекс Животовского) статистически достоверно увеличиваются вместе с ростом поглощенной генеративными органами растений дозы, т.е. генетическая дифференциация семенного потомства в сравняемых популяциях в значительной степени обусловлена радиационным воздействием. В целом полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования популяционно-генетических параметров для оценки биологических эффектов хронического воздействия в низких дозах.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы" (контракт № 02.512.11.0012) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-04-00631).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisher R.A. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford: Clarendon Press, 1930. 145 p.
2. Bradshaw A.D. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1991. V. 33. P. 289–305.
3. Шевченко В.А., Печкуренков В.Л., Абрамов В.И. Радиационная генетика природных популяций. М.: Наука, 1992. 221 с.
4. Wurgler F.E., Kramer P.G.N. // Mutagenesis. 1992. V. 7. P. 321–327.
5. Hebert P.D.N., Luiker M.M. // Sci. Total. Environ. 1996. V. 191. P. 23–56.
6. Prus-Glowacki W., Wojnicka-Poltorak A., Oleksyn J., Reich P.B. // Water, Air and Soil Pollution. 1999. V. 116. P. 395–402.
7. Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D.N. et al. // Mutat. Res. 2000. V. 463. P. 33–51.
8. Theodorakis C.W. // Ecotoxicology. 2001. V. 10. P. 245–256.
9. Коршиков И.И., Духарев В.А., Котова А.А. и др. // Цитология и генетика. 1991. Т. 25. № 6. С. 60–64.
10. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1989. 328 с.
11. Ульянова Е.В., Позолотина В.Н. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 5. С. 579–584.
12. Кальченко В.А., Калабушкин В.А., Рубанович А.В. // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 676–684.
13. Кальченко В.А., Архипов Н.П., Федотов И.С. // Генетика. 1993. Т. 29. № 2. С. 266–273.
14. Федотов И.С., Кальченко В.А. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 3. С. 268–278.
15. Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Dikarev V.G. et al. // Multiple Stressors: a Challenge for the Future. Dordrecht: Springer, 2007. P. 73–89.
16. Gonzalez-Martinez S.C., Krutovsky K.V., Neale D.B. // New Phytologist. 2006. V. 170. P. 227–238.
17. Sparrow A.H., Woodwell G.M. // Radiat. Botany. 1962. V. 2. P. 9–26.
18. Карабань Р.Т., Мишенков Н.Н., Пристер Б.С. и др. // Проблемы лесной радиоэкологии: Тр. ИПГ. Вып. 38. М.: Гидрометеиздат, 1979. С. 27–52.
19. Козубов Г.М., Таскаев А.И. Радиобиологические и радиоэкологические исследования древесных растений. СПб.: Наука, 1994. 256 с.
20. Гераськин С.А., Дикарева Н.С., Удалова А.А. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 5. С. 607–614.
21. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.
22. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
23. НРБ-99. Нормы радиационной безопасности. СП 2.6.1.758-99. М.: Минздрав России, 1999.
24. Спиридонов С.И., Фесенко С.В., Гераськин С.А. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 4. С. 432–438.
25. Ramzaev V., Botter-Jensen L., Thomsen K.J. et al. // J. Environ. Radioactivity. 2008. V. 99. P. 1154–1164.
26. Алтухов Ю.П., Крутовский К.В., Гафаров Н.И. и др. // Генетика. 1986. Т. 22. № 8. С. 2135–2151.
27. Гончаренко Г.Г., Кривко В.Г., Потенко В.В. и др. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35. № 4. С. 365–369.
28. Белоконь Ю.С., Политов Д.В., Белоконь М.М. и др. // Генетика. 1995. Т. 31. № 11. С. 1521–1528.
29. Гулин В.В., Кальченко В.А., Закиров С.А. и др. // Генетика. 1989. Т. 25. № 7. С. 1256–1260.
30. Hamrick J.L., Linhart Y.B., Mitton J.B. // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1979. V. 10. P. 173–200.
31. Ульянова Е.В., Позолотина В.Н., Саранульцев И.Е. // Экология. 2004. № 5. С. 349–357.
32. Антонова Е.В., Позолотина В.Н. // Экология. 2007. № 5. С. 355–361.
33. Духарев В.А., Коршиков И.И., Рябокоть С.М., Котова А.А. // Цитология и генетика. 1992. Т. 26. № 3. С. 7–11.
34. Саранульцев Б.И., Гераськин С.А. Генетические основы радиорезистентности и эволюция. М.: Энергоатомиздат, 1993. 208 с.
35. Животовский Л.А. Интеграция полигенных систем в популяциях. М.: Наука, 1984. 184 с.
36. Крутовский К.В. // Успехи совр. биологии. 1988. Т. 106. Вып. 3(6). С. 323–339.
37. Алтухов Ю.П., Духарев В.А., Животовский Л.А. // Генетика. 1983. Т. 19. № 2. С. 264–276.
38. Дубинин Н.Н., Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. и др. // Докл. АН СССР. 1975. Т. 225. № 3. С. 693–696.

Поступила в редакцию
12.09.2008

Genetic Variability in Scots Pine Populations from the Bryansk Region Radioactively Contaminated as a Result of the Chernobyl NPP Accident

S. A. Geras'kin, J. C. Vanina, V. G. Dikarev, T. A. Novikova, A. A. Oudalova, S. I. Spiridonov

*Russian Institute of Agricultural Radiology and Agroecology, Obninsk, 249020 Russia;
e-mail: stgeraskin@gmail.com*

The method of isozymic analysis of megagametophytes is used for an estimation of genetic variability in populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), inhabiting contrast on the level of radioactive contamination (60–17800 Bq/kg on ^{137}Cs) sites in the Bryansk region, undergone to radioactive pollution as a result of the Chernobyl accident. Values of all investigated parameters of genetic variability (heterozygosity, frequency of polymorphic loci, Jivotovski index) and frequencies of the mutations for loss of enzymatic activity increase with a dose absorbed by critical organs of pine trees. Presented data show that a high level of mutation occurrence is intrinsic for descendants (seeds) of pine trees in the investigated populations, and genetic diversity in the populations is essentially conditioned by radiation exposure.