

© П. Ю. Волкова, С. А. Гераськин

ГНУ ВНИИСХРАЭ
Россельхозакадемии, Обнинск

✿ **Исследован полиморфизм ферментов антиоксидантной системы в эндоспермах и зародышах семян сосны обыкновенной из загрязнённых в результате аварии на Чернобыльской АЭС районов Брянской области. Частота мутаций изоферментных локусов, эффективное число аллелей и гетерозиготность возрастают вместе с увеличением поглощённой в репродуктивных органах сосны дозой. В экспериментальных популяциях повышено внутривидовое разнообразие и частота встречаемости редких морф. Генетическая дифференциация исследованных популяций обусловлена повышенной частотой встречаемости редких аллелей.**

✿ **Ключевые слова:** сосна обыкновенная; авария на Чернобыльской АЭС; радиоактивное загрязнение; хроническое облучение; антиоксидантные ферменты; полиморфизм; редкие аллели; нуль-аллели.

ПОЛИМОРФИЗМ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧАЕМЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Леса играют важную роль в поддержании устойчивого состояния биосферы и активно используются человеком в хозяйственных и рекреационных целях. Нарушения генетической структуры доминирующих в лесных экосистемах и характеризующихся длительным жизненным циклом древесных видов вследствие потери ценных аллельных вариантов и их комбинаций ведут к уменьшению пластичности и адаптивности в последующих поколениях. В свою очередь, снижение устойчивости доминирующих видов вызывает изменения в структуре ценоза, которые могут повлечь за собой утрату некоторых входящих в экосистему зависимых видов (Whitham et al., 2006). Поэтому для успешной адаптации лесных экосистем к меняющимся условиям окружающей среды и возрастающей антропогенной нагрузке необходимо сохранение генетического разнообразия составляющих экосистемы видов.

В результате радиационных аварий на ПО «Маяк» (1957) и Чернобыльской АЭС (1986) лесные экосистемы пострадали в наибольшей степени, т. к. кроны деревьев задерживают значительную часть атмосферных выпадений и медленно самоочищаются от них (Тихомиров, 1972). Среди древесных растений наиболее радиочувствительны обладающие крупными хромосомами голосеменные (Сарапульцев и др., 1993). После аварии на ЧАЭС площадь летального поражения сосновых лесов составила 500–600 га, а сосновых насаждений с сильной и средней степенью повреждения соответственно 3000 и 12 000 га (Козубов и др., 1994). На загрязнённых в результате аварии на ПО «Маяк» территориях к осени 1959 г. сосна полностью погибла на площади 2000 га (Алексахин и др., 2001). Значительно большие территории лесных массивов подверглись радиоактивному загрязнению, уровни которого не были достаточны для массовой гибели деревьев. Вопрос об отдалённых последствиях хронического радиационного воздействия для этих лесных экосистем остаётся актуальным до настоящего времени.

Способность популяции к адаптации связана с величиной генетического полиморфизма признаков, которые подвергаются отбору (Bradshaw, 1991; Fisher, 1930). Существуют указания на то, что техногенное воздействие может изменять структуру внутривидовой изменчивости (Алтухов, 2003; Шевченко и др., 1992). Однако до настоящего момента нет полного понимания того, какие изменения происходят в генофонде природных популяций, развивающихся в условиях хронического низкодозового воздействия, интенсивность которого недостаточна для проявления радиационных эффектов в фенотипе особей. Не вполне ясно, как сказываются 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 (Гераськин и др., 2009; Geraskin et al., 2011; Волкова и др., 2012)

С помощью электрофоретических методов анализа можно идентифицировать мутации, которые невозможно выявить на организменном уровне, а также установить соотношение гомозигот и гетерозигот в выборке. Гистохимические методы окрашивания разработаны для многих ферментов. Анализ изоферментного полиморфизма позволяет оценить частоту мутационных событий для конкретных локусов и популяции в целом и традиционно является одним из важнейших методов изучения генетических процессов в популяциях (Алтухов, 2003).

Поступила в редакцию 22.02.2013
Принята к публикации 11.07.2013

Воздействие ионизирующей радиации на живые организмы в значительной степени обусловлено радиолизом молекул воды с образованием крайне токсичных реактивных форм кислорода (РФК) (Кудряшов, 2004). В их элиминации принимает участие ряд ферментов-антиоксидантов, важнейшими из которых являются супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы и ферменты, включённые в аскорбат-глутатионовый цикл. Эти ферменты распределены по компартментам клетки, где в норме происходит образование РФК в результате нормального метаболизма. В условиях стресса количество молекул ферментов и их полиморфизм могут возрастать (Полеская, 2007).

Целью работы был анализ полиморфизма ферментов антиоксидантной системы — супероксиддисмутазы (SOD, К.Ф. 1.15.1.1), глутатионредуктазы (GR, К.Ф. 1.6.4.2) и глутатионпероксидазы (GPX, К.Ф. 1.11.4.2) в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на ЧАЭС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Сосна обыкновенная, *Pinus sylvestris* L., — основной лесобразующий вид Северной Евразии. В лесных сообществах сосна является видом-эдикатором, в значительной степени влияющим на структуру и функции экосистемы. Данные о высокой радиочувствительности хвойных растений были получены в начале 60-х годов прошлого века в Брукгейвенской лаборатории США

(Sparrow et al., 1968) и подтверждены в ходе эксперимента «Экос» на Южном Урале (Карабань и др., 1979). Наиболее чувствительны к радиационному воздействию репродуктивные органы хвойных растений (Козубов и др., 1994). Если у большинства покрытосеменных видов репродуктивный цикл длится несколько месяцев, то у сосны с момента закладки генеративных органов до созревания семян проходит более двух лет (Козубов и др., 1994). В условиях хронического действия техногенных факторов столь длительный цикл развития ведёт к накоплению в клетках семян достаточного для индикации внешнего воздействия количества повреждений ДНК. Эндосперм сосны является гаплоидным, что позволяет легко оценить электрофоретическим методом количество и спектр мутаций на ранних постгаметических стадиях.

Район исследования

Исследование проводили в наиболее загрязнённых радионуклидами районах Брянской области — Новозыбковском, Клинецком и Красногорском. Экспериментальные участки Всероссийский научно-исследовательский институт удобрений и агропочвоведения (ВИУА), Старые Бобовичи (СБ), Заборье поле (ЗП), Заборье кладбище (ЗК) расположены приблизительно в 200 км северо-восточнее ЧАЭС (рис. 1). Непосредственно после аварии радиоактивное загрязнение некоторых участков на этой территории превышало 1 МБк/м² (Ramzaev et al., 2008). Участки однородны по климатическим характеристикам и физико-химическим свойствам почв, древостой гомогенен, сосновые деревья занимают значительную часть фитоценоза. Контрольный участок (К) расположен в Выгоничском районе Брянской области.



Рис. 1. Расположение экспериментальных участков в 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-01 Т на высоте 1 м от поверхности земли в 5–7-кратной повторности под каждым деревом, с которого отбирали шишки и пересчитывали в единицы измерения поглощённой дозы ($1 \text{ Р} = 8,76 \times 10^{-3} \text{ Гр}$). Мощность дозы в воздухе на экспериментальных участках менялась в пределах 0,37–1,21 $\mu\text{Гр/ч}$ (0,1 $\mu\text{Гр/ч}$ на контрольном участке). Подробное описание экспериментальных участков представлено в (Geraskin et al., 2011).

Отбор проб для исследования

В декабре 2009–2010 годов были отобраны пробы почвы и биологического материала (шишки) для определения уровней загрязнения радионуклидами и химическими элементами, 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 от 1,5 до 2 метров 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 в условиях естественного радиационного фона до конца февраля. Затем шишки доставляли в лабораторию и хранили при комнатной температуре и низкой влажности до раскрытия и высыпания семян, которые обескряливали вручную. Для электрофоретического анализа использовали только свободно выпавшиеся, хорошо выполненные семена.

Определение физико-химических характеристик почвы и содержания тяжёлых металлов в почве и шишках

В почвенных образцах оценивалось значение pH, содержание гумуса и основных минеральных компонентов, катионообменная способность и гидrolитическая кислотность.

Для оценки степени загрязнения тяжёлыми металлами, в пробах почвы и шишек были проанализированы концентрации Cd, Cu, Co, Cr, Mn, Ni, Pb и Zn. Концентрации тяжёлых металлов определяли при помощи плазменного оптического эмиссионного спектрометра в соответствии со стандартом ISO 11047.

Определение содержания радионуклидов в образцах почвы и биологического материала

Содержание ^{40}K , ^{137}Cs , ^{226}Ra и ^{232}Th в пробах почвы определяли методом γ -спектрометрии на многоканальном анализаторе IN-1200 (Франция) с германиевым детектором GEM-1200 (США).

Для оценки содержания радионуклидов по одной случайно отобранной шишке с каждого дерева на экспериментальном участке объединяли в одну пробу. Содержание ^{137}Cs в шишках определяли методом γ -спектрометрии, а содержание ^{90}Sr — радиохимическим методом в соответствии с методикой Рослесхоза (Методические рекомендации по проведению контроля содержания радионуклидов в лесных ресурсах, 2009) по радиохимическому определению стронция-90 в пробах почвы и растительных материалов. Отобранные пробы минерализовали методом сухого озоления. ^{90}Sr выделяли оксалатным методом, обрабатывая золу раствором HCl с концентрацией 6 моль/дм³ при нагревании до кипения. Содержание ^{90}Sr в анализируемых образцах оценивали по формуле

$$A_{90\text{Sr}} \frac{A_{90\text{Sr}}}{W_{\text{Sr}} \times W_{\text{Y}} \times m},$$

где: $A_{90\text{Sr}}$ — удельная активность ^{90}Sr в анализируемом образце, Бк/кг; A — активность ^{90}Y в счетном образце, Бк; W_{Sr} — химический выход стронция; W_{Y} — химический выход иттрия; m — масса анализируемого образца в воздушно-сухом состоянии, кг.

Изоферментный анализ

Для исследования изоферментного полиморфизма в экспериментальных популяциях были выбраны три антиоксидантных фермента: супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза и глутатионпероксидаза. 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 %-й раствор тритона X-100 и 0,2 %-й раствор β -меркаптоэтанола. Разделение экстрактов проводили в вертикальных пластинах 7,5 %-го полиакриламидного геля в трис-HCl буфере с pH 8,0 на установке «Hoefeg SE 600 Chroma». Полимеризацию геля проводили в течение 30 мин. В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер с pH 8,9. Время электрофореза составляло 1,5–2 ч при токе 60–80 мА. Гистохимическое окрашивание выполнялось по (Manchenko, 1994) с модификациями. Было проанализировано в среднем по 15 эндоспермов и зародышей с каждого дерева. Семена деревьев с разных участков были перемешаны и зашифрованы, идентификация образцов проводилась в конце эксперимента, после расшифровки и документирования зимограмм. В образцах 2009 г. анализировали полиморфизм супероксиддисмутазы в эндоспермах и зародышах семян сосны, а в образцах 2010 г. — полиморфизм глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в эндоспермах. Анализ зародышей семян сосны в образцах 2010 г. не проводился, поскольку из-за низкой концентрации ферментов в экстракте зародышей идентификация зимограмм была затруднена. Всего было проанализировано более 9000 locus-тестов.

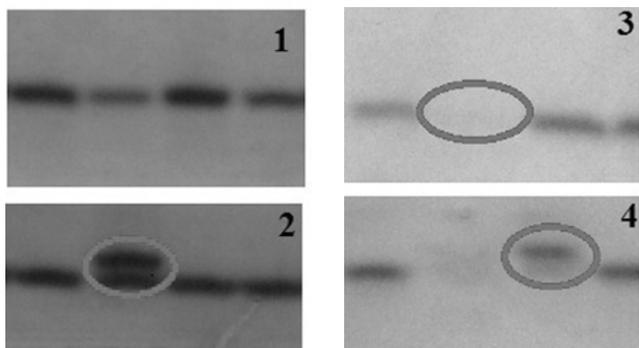


Рис. 2. Три типа мутаций, детектируемых на зимограмме. 1 — норма; 2 — дупликация; 3 — нуль-мутация; 4 — изменение электрофоретической подвижности

Идентификацию аллозимов проводили по их относительной электрофоретической подвижности. Наиболее часто встречающийся аллозим обозначали как 1,00, остальные аллозимы этого локуса — в соответствии с их электрофоретической подвижностью относительно 1,00. Оценивали три вида мутационных событий в изоферментных локусах (рис. 2). Нуль-мутации возникают в результате делеций или генных мутаций, что приводит либо к подавлению функциональной активности фермента, либо к прекращению его биосинтеза. Другие типы регистрируемых мутационных событий представляют собой мутации, меняющие структуру и заряд изофермента, идентифицируемые по изменению электрофоретической подвижности продукта локуса, и дупликации, которые могут возникать в результате неравного кроссинговера в процессе оогенеза, когда два аллеля одного локуса совмещаются в одной хромосоме.

На зимограмме нуль-мутации определяются как отсутствие полосы ферментативной активности. При анализе некоторых семян нуль-мутации выявлялись в нескольких локусах на одной зимограмме. Подобные семена считались мёртвыми и в анализе не учитывались. Дупликации характеризуются появлением двух зон активности на зимограмме, расположенных одна над другой. Изменениями электрофоретической подвижности изофермента считалось обнаружение продукта локуса вне ранее выявленных зон активности разных аллелей. Так, если в локусе выявлены два аллеля 1,00 и 1,10, то единичное появление полосы на уровне 0,90 считалось мутационным событием.

Статистический анализ экспериментальных данных

Для каждой популяции рассчитывали частоты аллелей и показатели, характеризующие генетическую изменчивость. Для оценки частоты аллелей использовали несмещённую оценку частот (Животовский, 1991, с. 70) по формуле:

$$p = \frac{n}{N},$$

где n — количество случаев обнаружения исследуемого аллеля в выборке, N — общий объём выборки.

В случае гаплоидного генотипа такая оценка оправдана, поскольку мы не имеем дела с сочетаниями аллелей.

Статистическая ошибка определялась по формуле:

$$s_p = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}.$$

Для оценки фенотипического разнообразия популяций использовали индекс Животовского (μ), 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.

Статистическая ошибка определялась по формуле

$$s_\mu = \sqrt{\frac{\mu(m-\mu)}{N}}.$$

Для детализации аллозимной структуры популяций оценивали долю редких морф:

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

Статистическая ошибка определялась по формуле:

$$s_h = \sqrt{\frac{h_\mu(1-h_\mu)}{N}}.$$

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

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

Значимость различий по частоте встречаемости аллелей между контрольной и экспериментальными популяциями оценивали с помощью модифицированного χ^2 -критерия, рекомендованного (Животовский, 1991, с. 123) для случая небольших объёмов выборок и наличия редких фенотипов в популяции. Статистику критерия и число степеней свободы рассчитывали как $\chi^2_G = c\chi^2$; $v_G = cv$, где c — поправка, учитывающая малость ожидаемых численностей некоторых аллелей. Для определения различий между средними значениями использовали критерий Стьюдента.

Для оценки ожидаемой гетерозиготности применяли формулу (Животовский, 1991, с. 107):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2,$$

Статистическая ошибка определялась по формуле:

$$s_p = \sqrt{\frac{2(n-1)}{n^3} \left[(3-2n)(1-H_e)^2 + 2(n-2) \sum_{i=1}^m p_i^3 + (1-H_e) \right]},$$

где $n = 2N$ — численность аллелей, а для расчёта наблюдаемой гетерозиготности (Животовский, 1991, с. 109):

$$H_o = \frac{1}{N} \sum_{i \neq j} N_{ij},$$

где N — общее число особей, N_{ij} — число особей, классифицированных как гетерозиготы.

Статистическая ошибка определялась по формуле:

$$s_p = \frac{H_o(1-H_o)}{N}.$$

В качестве метрики в иерархическом кластерном анализе по методу невзвешенных арифметических средних использовали генетическое расстояние Неи (D), которое рассчитывали по формуле (Nei, 1972):

$$D = -\ln r = -\ln \bar{J}_{pq} + \frac{1}{2} (\ln \bar{J}_p + \ln \bar{J}_q),$$

где \bar{J} — усреднённая по всем локусам теоретическая гомозиготность в первой выборке, \bar{J}_q — во второй выборке, \bar{J}_{pq} — взаимная идентичность двух выборок по всем локусам. На основе матрицы генетических расстояний с помощью программы Statistica была построена дендрограмма, демонстрирующая соподчинённость исследуемых популяций.

Для анализа результатов по вышеприведённым формулам использовалось программное обеспечение Microsoft Office Excel. Формулы прописывались самостоятельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Техногенное загрязнение экспериментальных участков и поглощённые в генеративных органах сосны дозы

Почвы всех экспериментальных участков близки по физико-химическим свойствам, а содержание тяжёлых металлов и доступных растениям их подвижных форм не превышает допустимых уровней (Geraskin et al., 2011; Гераськин и др., 2008). Качественно иная картина наблюдается в отношении радиоактивного загрязнения экспериментальных участков, основной вклад в которое вносит ^{137}Cs — ведущий дозообразующий радионуклид на загрязнённых 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, удельная активность ^{137}Cs в почвах экспериментальных участков в 20–1320 раз превышает таковую на контрольном участке. Содержание радионуклидов в шишках деревьев с загрязнённых радионуклидами участков значительно превышает этот параметр для контрольных популяций. Причём содержание ^{137}Cs в шишках всех исследованных участков выше содержания ^{90}Sr как минимум на порядок, хотя известно (Ipatyev, 1999), что поглощение ^{90}Sr деревьями из почвы в 5–10 раз выше, чем ^{137}Cs . Наблюдаемое соотношение радионуклидов в шишках обусловлено низким содержанием ^{90}Sr в исследуемых почвах. Максимальное содержание ^{137}Cs и ^{90}Sr в шишках экспериментальных участков превышает этот параметр для контрольных участков в 315 и 78 раз соответственно (Geraskin et al., 2011).

Для оценки дозовых нагрузок на генеративные органы сосновых деревьев была разработана дозиметрическая модель (Спиридонов и др., 2008; Geraskin et al., 2011). Результаты расчёта поглощённых в генеративных орга-

Таблица 1

Радиоактивное загрязнение экспериментальных участков и поглощенные в генеративных органах сосны дозы

Участок	^{137}Cs , 0–5 см, Бк/ кг	Мощность дозы в воздухе, мкГр/час	Концентрации радионуклидов в шишках, Бк/кг		Мощность дозы, мГр/год		
			^{137}Cs	^{90}Sr	D_{γ} , мГр/год	D_{β} , мГр/год	$D_{\text{общ}}$, мГр/год
К	73.2	$0,10 \pm 0,01$	$30,0 \pm 3,7$	$1,32 \pm 0,65$	0,12	0,01	0,14
ВИУА	1570	$0,37 \pm 0,03$	948 ± 13	$16,79 \pm 1,93$	6,6	0,3	6,9
СБ	16900	$0,49 \pm 0,16$	342 ± 8	$20,81 \pm 1,31$	22,7	0,2	22,9
ЗП	39190	$0,73 \pm 0,18$	3246 ± 32	$64,25 \pm 2,20$	90,2	1,2	91,4
ЗК	96900	$1,21 \pm 0,23$	1008 ± 18	$83,00 \pm 2,19$	129,4	0,5	129,9

нах сосны доз приведены в таблице 1. Основной вклад в формирование полученной генеративными органами сосны дозы, согласно расчётам с использованием дозиметрической модели, вносит содержащийся в верхнем 10 см слое почвы ¹³⁷Cs. Вклад β-излучения, в зависимости от участка, составляет 0,4–9,3 %. Результаты расчетов свидетельствуют о том, что поглощённая в генеративных органах доза от распределённых в пологе леса радионуклидов формируется главным образом за счёт β-излучения.

Изоферментный полиморфизм GR и GPX в популяциях сосны обыкновенной

Полиморфизм исследуемых популяций по ферменту SOD был подробно описан нами ранее (Волкова и др., 2012). У глутатионредуктазы был идентифицирован один полиморфный локус, у глутатионпероксидазы — три, но для анализа были использованы два из них, обладающие наилучшим разрешением. При анализе в локусах GR и GPX-1 выявлено два аллеля, а в локусе GPX-2 — три. Из полученных данных следует (табл. 2),

Таблица 2

Частоты аллелей локусов SOD, GR и GPX

Участок	Локус	Аллель	Частота	Локус	Аллель	Частота	
Контроль N = 480	GR	1,00	0,848 ± 0,024	GPX-2	0,95	0 + 0,441	
		1,10	0,152 ± 0,024		1,00	0,901 ± 0,020	
		n	—		1,20	0,094 ± 0,020	
	GPX-1	0,80	0 + 0,441	SOD-2	n	0,005 ± 0,004	
		1,00	1 – 0,444		1,00	1 – 0,415	
		n	—		n	—	
	SOD-1	1,00	–0,415	SOD-3	1,00	1 – 0,415	
		1,10	0 + 0,411		n	—	
		n	—				
	ВИУА N = 405	GR	1,00	0,818 ± 0,026	GPX-2	0,95	0 + 0,438
			1,10	0,173 ± 0,025		1,00	0,901 ± 0,020
			n	0,009 ± 0,006		1,20	0,094 ± 0,020
GPX-1		0,80	0 + 0,438	SOD-2	n	0,005 ± 0,004	
		1,00	0,982 ± 0,009		1,00	1 – 0,553	
		n	0,018 ± 0,009		n	—	
SOD-1		1,00	0,995 ± 0,006	SOD-3	1,00	1 – 0,553	
		1,10	0 + 0,547		n	—	
		n	0,006 ± 0,006				
Старые Бобовичи N = 405		GR	1,00	0,797 ± 0,029	GPX-2	0,95	0 + 0,500
			1,10	0,178 ± 0,027		1,00	0,866 ± 0,025
			n	0,025* ± 0,011		1,20	0,118 ± 0,023
	GPX-1	0,80	0,088** ± 0,020	SOD-2	n	0,016 ± 0,009	
		1,00	0,886** ± 0,023		1,00	1 – 0,474	
		n	0,026 ± 0,011		n	—	
	SOD-1	1,00	0,986 ± 0,008	SOD-3	1,00	1 – 0,474	
		1,10	0 + 0,470		n	—	
		n	0,014 ± 0,008				
	Заборье Поле N = 495	GR	1,00	0,764* ± 0,028	GPX-2	0,95	0,072** ± 0,017
			1,10	0,173 ± 0,025		1,00	0,754** ± 0,028
			n	0,063** ± 0,015		1,20	0,114 ± 0,02
GPX-1		0,80	0,102** ± 0,020	SOD-2	n	0,060** ± 0,015	
		1,00	0,847** ± 0,023		1,00	0,987 ± 0,008	
		n	0,051** ± 0,014		n	0,013 ± 0,008	
SOD-1		1,00	0,756* ± 0,029	SOD-3	1,00	0,996 ± 0,004	
		1,10	0,200* ± 0,027		n	0,004 ± 0,004	
		n	0,044* ± 0,014				
Заборье Кладбище N = 465		GR	1,00	0,777 ± 0,026	GPX-2	0,95	0,063** ± 0,015
			1,10	0,159 ± 0,022		1,00	0,778** ± 0,026
			n	0,064** ± 0,015		1,20	0,108 ± 0,02
	GPX-1	0,80	0,095** ± 0,018	SOD-2	n	0,041** ± 0,012	
		1,00	0,850** ± 0,023		1,00	0,987 ± 0,008	
		n	0,055** ± 0,014		n	0,013 ± 0,008	
	SOD-1	1,00	0,676** ± 0,031	SOD-3	1,00	0,991 ± 0,006	
		1,10	0,271** ± 0,003		n	0,008 ± 0,006	
		n	0,053* ± 0,015				

* — отличие от контроля значимо на уровне p < 0,05; ** — отличие от контроля значимо на уровне p < 0,01. Примечания к таблице: участки расположены по возрастанию мощности дозы. n — нуль-аллель, «—» — нуль-мутации на данном участке не выявлены. Под названием участков расположен объём выборки N (количество семян, проанализированных на участке)

Таблица 3

Частоты разных типов мутаций в эндоспермах семян

Участок	Число локус-тестов	Частота нуль-мутаций, %	Частота дупликаций, %	Частота изменений электрофоретической подвижности, %
К	1390	0,07 ± 0,07	—	—
ВИУА	1211	0,66* ± 0,23	—	0,08 ± 0,08
СБ	1215	1,40** ± 0,33	0,49** ± 0,20	0,49* ± 0,20
ЗП	1434	3,84** ± 0,51	1,12** ± 0,28	0,98** ± 0,26
ЗК	1412	4,18** ± 0,53	1,63** ± 0,34	1,13** ± 0,28

* — отличие от контроля значимо на уровне $p < 0,05$; ** — отличие от контроля значимо на уровне $p < 0,01$

что с увеличением поглощённой генеративной органами растений дозы растёт количество и частота редких аллелей. Коэффициент корреляции для (GPX-1, 0,80) составляет 85 %; для (GPX-2, 0,95) — 86 %; для (GPX-2, 1,20) — 62 %; для (SOD-1, 1,10) — 63 %.

Частота и спектр мутаций в локусах изученных изоферментов

Проведена оценка трёх видов мутационных событий в изоферментных локусах. Наибольший вклад в общую частоту мутаций вносят нуль-мутации. В таблице 3 представлены частоты мутаций всех рассматриваемых типов по шести ферментным локусам, кодирующим биосинтез трёх ферментов антиоксидантной защиты. Полученные данные хорошо согласуются с другими исследованиями (Алтухов и др., 1983; Федотов и др., 2006), в которых показано, что изменения электрофоретической подвижности и дупликации являются относительно редкими типами мутаций по сравнению с нуль-мутациями. Мутации в контрольной популяции крайне редки, их частота

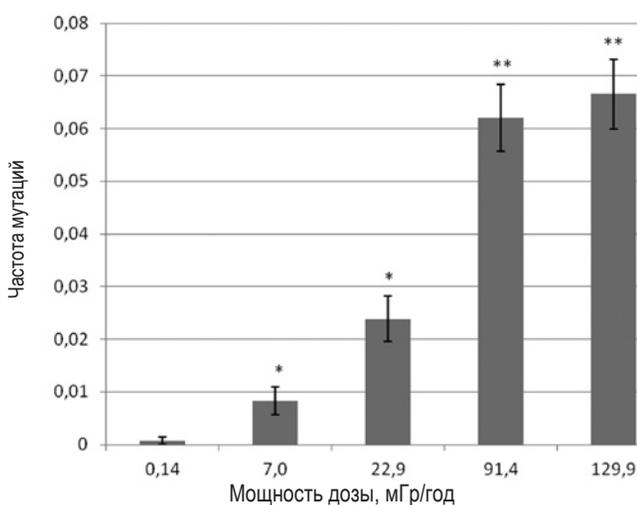


Рис. 3. Общая частота мутаций в эндоспермах семян по трём ферментам. На гистограмме отложены стандартные ошибки. * — различия с контролем значимы, $p < 0,05$; ** — различия с контролем значимы, $p < 0,01$

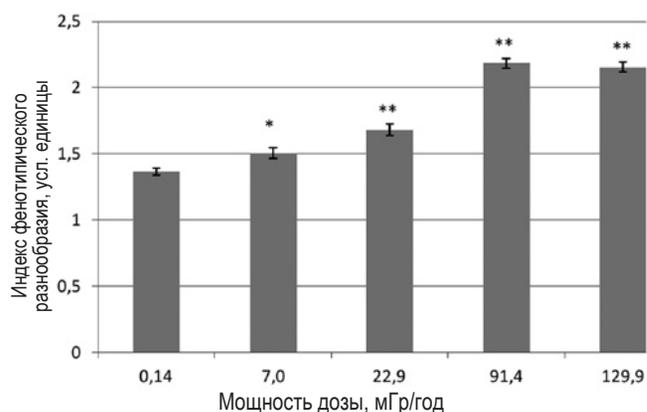


Рис. 4. Фенотипическое разнообразие популяций сосны обыкновенной по трём ферментам. На гистограмме отложены стандартные ошибки. * — различия с контролем значимы, $p < 0,05$; ** — различия с контролем значимы, $p < 0,01$

соответствует уровню спонтанного мутагенеза изоферментных локусов у сосны обыкновенной (Алтухов и др., 1983). Средняя частота мутаций (рис. 3) по трём ферментам значимо ($r = 99\%$, $p < 0,01$) возрастает вместе с ростом поглощённой генеративными органами растений дозы.

Внутрипопуляционное разнообразие

По значению индекса Животовского (среднее число аллелей в популяции с учётом их частоты) изученные локусы принято делить (Животовский, 1991) на три группы: мономорфные, со средним ($1 < \mu < 3$) и высоким ($\mu > 3$) уровнем изменчивости. Все изученные нами локусы попадают в группу со средним уровнем изменчивости. Индексы фенотипического разнообразия в исследованных популяциях значимо отличаются от контроля (рис. 4). Полученная таким образом оценка изменчивости несколько занижена по сравнению с реально существующей в популяции, поскольку часть единичных аминокислотных замен (являющихся синонимичными) не выявляется электрофоретически (Алтухов, 2003).

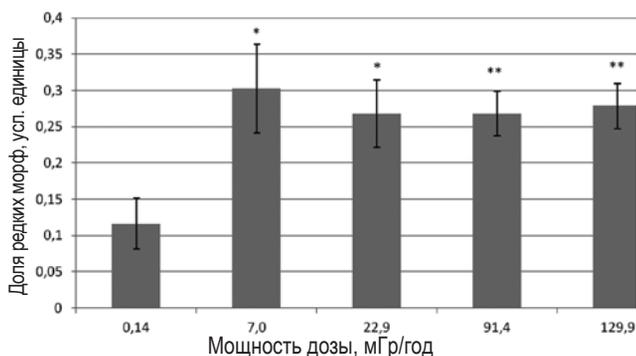


Рис. 5. Доля редких морф в популяциях сосны обыкновенной. На гистограмме отложены стандартные ошибки. * — различия с контролем значимы, $p < 0,05$; ** — различия с контролем значимы, $p < 0,01$

Доля редких морф и эффективное число аллелей

Доля редких морф характеризует фенотипическую структуру популяции, оценивая соотношение между частотами наиболее редких и наиболее частых фенотипов в выборке. Этот параметр резко возрастает (рис. 5) в популяциях, населяющих загрязнённые радионуклидами участки, что связано с появлением новых аллелей в нескольких ферментных системах (нуль-аллели, аллель 0,80 в системе GPX-1 и 0,95 в системе GPX-2). С ростом уровня радиоактивного загрязнения изменяется только частота встречаемости редких морф, но не их количество, поэтому значения этого показателя для разных экспериментальных участков значимо не различаются.

Эффективное число аллелей характеризует их вклад в аллельное разнообразие локусов. Этот параметр возрастает (табл. 4) вместе с уровнем радиационного воздействия, поскольку в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной редкие аллели вносят больший вклад в аллельное разнообразие.

Гетерозиготность

Оценённые по шести локусам трёх ферментных систем величины наблюдаемой (Ho) и ожидаемой (He) гетерозиготности контрольной популяции близки к оценкам, полученным ранее для других видов сосен (Крутовский

Таблица 4

Эффективное число аллелей

Участок	Поглощенная доза, мГр/год	Эффективное число аллелей
Контроль	0,137	1,12 ± 0,01
ВИУА	6,96	1,16* ± 0,01
Старые Бобовичи	22,9	1,25** ± 0,02
Заборье Поле	91,4	1,54** ± 0,08
Заборье Кладбище	129,9	1,61** ± 0,04

* — отличие от контроля значимо на уровне $p < 0,05$;
** — отличие от контроля значимо на уровне $p < 0,01$

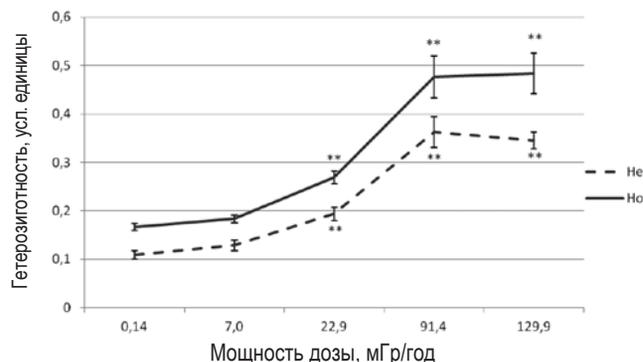


Рис. 6. Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность. На гистограмме отложены стандартные ошибки; ** — различия с контролем значимы, $p < 0,01$

и др., 1989). Качественно иная картина имеет место для наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности экспериментальных популяций, которые возрастают (рис. 6) вместе с уровнем радиоактивного загрязнения участков ($r = 99\%$, $p < 0,01$).

Генетическая дифференциация популяций

Для оценки генетической дифференциации исследуемых популяций был проведён кластерный анализ с использованием в качестве меры генетического расстояния по Ней (табл. 5). Из представленных в таблице 5 данных следует, что генетические расстояния между населяющими наиболее загрязнённые участки популяциями ЗП, ЗК и контрольной популяцией К, достоверно различаются, тогда как значимых различий между контролем и популяциями ВИУА и СБ нет. Это нашло отражение и в результатах кластерного анализа — исследуемые популяции разделились (рис. 7) на две группы, резко различающиеся по уровню радиоактивного загрязнения участков, на которых они произрастают.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мутагенный эффект хронического низкодозового воздействия

Сразу после появления электрофоретических методов анализа их стали широко использовать для тестирования на мутагенность. Оценивая межпопуляционное

Таблица 5

Генетические расстояния между исследуемыми популяциями

Популяция	К	ВИУА	СБ	ЗП	ЗК
К	0	0,0002	0,0064	0,0248	0,0137
ВИУА	0,0002	0	0,0020	0,0253	0,0139
СБ	0,0064	0,0020	0	0,0256	0,0164
ЗК	0,0248**	0,0253**	0,0256*	0	0,0027
ЗП	0,0137*	0,0139*	0,0164*	0,0027	0

* — различия с контролем значимы, $p < 0,05$; ** — различия с контролем значимы, $p < 0,01$

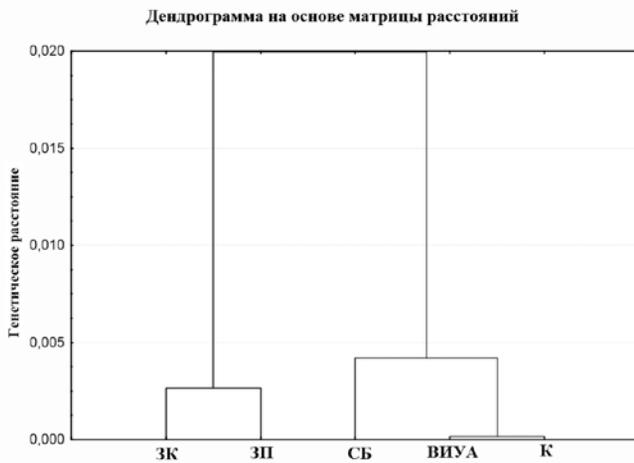


Рис. 7. Генетическая дифференциация исследуемых популяций

изменение частот аллелей определённого локуса, мы получаем возможность количественной оценки генетических процессов в популяции под действием внешних и внутренних факторов. Авария на ЧАЭС резко изменила условия существования популяций растений и животных на загрязнённых радионуклидами территориях, изменилась направленность и интенсивность отбора, что не могло не сказаться на генетических процессах в популяциях, вынужденных развиваться в условиях хронического радиационного воздействия (Глазко, 2008). Методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что частота нуль-мутаций в локусах, кодирующих изученные нами ферменты антиоксидантной системы, значимо ($p < 0,01$) превышает контрольный уровень и возрастает вместе с дозой, поглощённой генеративными органами растений (табл. 2). При суммировании данных по трём изученным ферментам аналогичная зависимость наблюдается и для относительно редких типов мутационных событий — изменений электрофоретической подвижности и дупликаций (табл. 3). Общая частота мутаций, таким образом, также возрастает вместе с плотностью радиоактивного загрязнения участков (рис. 3). При более высоких уровнях радиоактивного загрязнения, в популяциях сосны из 30-км зоны ЧАЭС, также наблюдалась высокая частота мутаций 20 ферментных локусов, в 4–17 раз превышающая контрольный уровень (Федотов и др., 2006). Отметим, что, по данным Федотова и др. (2006), наиболее редким видом мутаций были дупликации, наблюдавшиеся только при высоких уровнях облучения растений, а в нашей — изменения электрофоретической подвижности. В целом частота появления изменений электрофоретической подвижности и дупликаций в нашей работе сопоставимо низка, но в популяциях, населяющих наиболее загрязнённые радионуклидами участки (СБ, ЗК, ЗП), изменения электрофоретической подвижности встречаются реже, чем дупликации.

Индукцированные ионизирующим излучением мутации либо элиминируются из генофонда, либо увеличивают свою частоту в популяции, если обладают селективным преимуществом в конкретных условиях окружающей среды. Поэтому усиление радиационного воздействия может вести к быстрому (по эволюционным меркам) изменению генетической структуры популяции (Шевченко и др., 1991). Существует ряд показателей, позволяющий оценить эти изменения — гетерозиготность, фенотипическое разнообразие, доля редких морф, эффективное число аллелей. В нашем исследовании значения всех перечисленных показателей в популяциях, населяющих загрязнённые радионуклидами участки, значимо превышали контрольный уровень (табл. 4, рис. 4, 5, 6).

Гетерозиготность

Согласно данным Крутовского и др. (1989), оценки наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, основанные на анализе многочисленных исследований, выполненных на 26 видах рода *Pinus*, составили $H_o = 0,152 \pm 0,043$ и $H_e = 0,145 \pm 0,016$, что хорошо соответствует полученным в нашем исследовании оценкам для контрольной популяции ($H_o = 0,167 \pm 0,007$ и $H_e = 0,109 \pm 0,008$). В то же время гетерозиготность популяций, населяющих загрязнённые радионуклидами участки, превышает контрольный уровень и увеличивается вместе с плотностью радиоактивного загрязнения (рис. 6). В предыдущем исследовании на этих же популяциях, при анализе комплекса ферментов цикла Кребса, также было продемонстрировано (Гераськин и др., 2009), что наблюдаемая гетерозиготность в популяциях сосны с радиоактивно загрязнённых участков существенно выше, чем ожидаемая, и увеличивается вместе с мощностью дозы. Такой характер зависимости гетерозиготности от степени техногенного загрязнения участков наблюдали и другие исследователи. Действительно, обитающие в неблагоприятных условиях популяции (суровый климат, техногенное загрязнение) характеризуются повышенной гетерозиготностью по сравнению с обитающими в оптимальных условиях (Животовский, 1984; Коршиков и др., 1991). Уменьшение уровня гетерозиготности у составляющих популяцию особей, как правило, связано (Алтухов, 2003; Theodorakis, 2001) со снижением сопротивляемости к болезням, уменьшением скорости роста и снижением фертильности. Имеются данные (Кальченко и др., 1991; Федотов и др., 2006; Theodorakis, 2001), что гетерозиготы лучше приспособлены к условиям техногенного стресса. Средняя наблюдаемая гетерозиготность популяций сосны обыкновенной, населяющих участки в зоне воздействия выбросов крупных химических предприятий, была выше ожидаемой и увеличивалась с ростом техногенной нагрузки (Духарев и др., 1992). В совокупности результаты этих исследований свидетельствует о селективном преимуществе гетерозигот в условиях хронического техногенного воздействия.

Фенотипическое разнообразие

Полученные по трём ферментам данные позволяют заключить, что генетические процессы в популяциях направлены на увеличение фенотипического разнообразия, которое может быть оценено при помощи индекса Животовского. Фенотипическое разнообразие по всем изученным локусам значимо ($p < 0,01$) превышает контрольный уровень (рис. 4), что связывают (Гераськин и др., 2010) с реакцией популяции на стресс: в условиях давления техногенных факторов генетическая и фенотипическая изменчивость увеличивается, однако при чрезмерных уровнях стрессового воздействия наиболее чувствительные особи элиминируются, и внутривидовое разнообразие снижается (Духарев и др., 1992; Шуйская и др., 2012). Уровень внутривидового разнообразия в популяциях растений, произрастающих на загрязнённых территориях, определяется видовой чувствительностью, интенсивностью и природой техногенного воздействия. Этот тезис подтверждается на примере исследования аллозимной структуры популяций одуванчика лекарственного, населяющих берега р. Теча на Южном Урале, в котором индексы внутривидового разнообразия фоновой и экспериментальной популяций значимо не различались (Ульянова и др., 2004), несмотря на сопоставимые с нашим исследованием поглощённые растениями дозы. Следует отметить, что радиорезистентность голосеменных растений гораздо ниже, чем у покрытосеменных (Сарапульцев и др., 1993). Поэтому для достижения аналогичного эффекта в популяциях покрытосеменных растений необходимы большие мощности дозы. Действительно, при исследовании теми же авторами аллозимной структуры в популяциях одуванчика с территории ВУРС (Восточно-Уральского радиоактивного следа), где растения получали гораздо более высокие дозы, было показано (Антонова и др., 2007), что средние популяционные значения индекса Животовского превышают фоновые.

Доля редких морф и эффективное число аллелей

Мутационный процесс — главный источник появления новых аллелей, что, в свою очередь, ведёт к увеличению генетического разнообразия популяции. По доле редких морф все загрязнённые участки значимо отличаются от контрольных (рис. 5), но не друг от друга. Подобный эффект обусловлен резким возрастанием уровня хронического радиационного воздействия (мощность годовой дозы на контрольном и наименее загрязнённом экспериментальном участке ВИУА различается более чем в 50 раз), мутагенный эффект которого проявляется в увеличении числа редких аллельных вариантов (табл. 2). Дальнейший рост плотности радиоактивного загрязнения ведёт к увеличению частоты этих вариантов, а не их числа. Возрастание частоты редких аллелей в популяциях василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.), несколько десятилетий обитающих в ус-

ловиях хронического облучения на Восточно-Уральском радиоактивном следе, было показано в Кальченко и др. (1991, 1996).

Генетическая дифференциация экспериментальных популяций

В ходе кластерного анализа исследуемые популяции были разделены на две группы (рис. 7), что может быть связано как с их географическим положением, так и с хроническим радиационным воздействием. Так, техногенное загрязнение вызывало увеличение полиморфности и генетического разнообразия экспериментальных популяций фиалки трёхцветной, что обусловило их выделение в отдельный кластер (Slomka et al., 2011). Вместе с тем загрязнение тяжёлыми металлами не влияло (Muller et al., 2007) на генетическую подразделённость популяций маслёнка обыкновенного. Mengoni et al. (2000) показали, что на генетическую вариабельность популяций смолёвки оказывает влияние как географическое положение, так и загрязнение почв тяжёлыми металлами. В этом исследовании устойчивые к тяжёлым металлам популяции выделялись в отдельный кластер, несмотря на географическую близость с менее устойчивыми популяциями. Таким образом, на генетическую дифференциацию популяций влияют географическое положение, видовая принадлежность, тип и интенсивность техногенного воздействия, другие экологические факторы. Отметим, что популяции ЗП и ЗК географически гораздо ближе друг к другу, чем к остальным популяциям, поэтому их выделение в отдельный кластер может быть связано с их расположением и постоянным обменом генами, а не с радиационным воздействием. Обмен пыльцой и семенами между популяциями К, ВИУА и СБ невозможен из-за значительного расстояния между ними. Тем не менее, они объединены в один кластер из-за одинаково низкой частоты встречаемости редких аллелей.

Роль исследуемых ферментов в модификации радиационного воздействия

Метаболизм клеток растений в условиях стресса характеризуется повышенным образованием реактивных форм кислорода (РФК) (Elstner et al., 1994; Foyer et al., 2000). Радиационное воздействие также сопровождается оксидативным стрессом (Inze, 1995) за счёт радиолиза молекул воды во вне- и внутриклеточной среде. При радиолизе воды образуется множество РФК, исключительно реакционно-способных молекул, для нейтрализации которых в клетке используются системы антиоксидантной защиты. Поэтому в условиях хронического радиационного воздействия роль ферментов антиоксидантной системы возрастает. Исследователями изоферментного полиморфизма популяций в условиях хронического облучения часто незаслуженно игнорируется важнейшая антиоксидантная система — глутатионовая. Современные авторы (Tausz et al., 2004) отмечают центральную роль

метаболизма глутатиона в ответе растений на стресс. Нами были исследованы ключевые ферменты этой системы — глутатионредуктаза (GR) и глутатионпероксидаза (GPX). GR восстанавливает окисленный глутатион с использованием НАДФН в качестве восстановителя, а GPX участвует в детоксикации перекиси водорода и гидропероксидов липидов, используя GSH в качестве восстановителя (Gechev et al., 2006). Сам же глутатион является субстратом для различных пероксидаз, глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы, обеспечивает детоксикацию перекиси водорода, других гидропероксидов и токсических веществ. Полиморфизм ферментов SOD, GR и GPX в исследованных нами популяциях увеличивается (табл. 2, Волкова и др., 2012) вместе с уровнем радиоактивного загрязнения. В условиях повышенной продукции реактивных форм кислорода роль антиоксидантных ферментов существенно возрастает, что объясняет наблюдаемый нами биохимический полиморфизм. Возникновение редких аллелей антиоксидантных ферментов в популяции и увеличение их частоты может трактоваться как процесс, направленный на получение эволюционного преимущества в условиях индуцированного облучением хронического оксидативного стресса.

Полиморфизм антиоксидантной системы как ответ на хронический радиационный стресс

Запас экологической пластичности и генетическое разнообразие популяций определяется во многом количеством полиморфных признаков у составляющих её особей (Созинов, 1985). Выявленный в нашем исследовании высокий уровень мутагенеза в полиморфных ферментных локусах создаёт предпосылки к ускорению микроэволюционных процессов в хронически облучаемых популяциях. Поскольку зародышевые клетки в онтогенезе растений формируются гораздо позже, чем в онтогенезе животных, возникающие в соматических клетках радиационно-индуцированные генетические изменения могут быть переданы потомству (Малецкий и др., 2007). Эта фундаментальная особенность лежит в основе фенотипической пластичности растений и их способности быстро адаптироваться к изменяющимся условиям среды.

Остаётся неясным, вносит ли выявленная в нашем исследовании мутационная изменчивость вклад в адаптацию популяций к хроническому радиационному воздействию. Ранее на этих же популяциях было показано (Geraskin et al., 2011), что хроническое облучение, значимо увеличивая частоту цитогенетических нарушений, не оказывает значимого влияния на репродуктивный потенциал популяций и не влияет на устойчивость семян к дополнительному γ -облучению. Изоферментный полиморфизм в природных популяциях обычно не является нейтральным и связан с ролью ферментов в механизмах нейтрализации поллютантов или токсичных продуктов их опосредованного действия (Алтухов, 2003), т.е. разные

аллели полиморфных локусов могут по-разному влиять на приспособленность к данным условиям существования. Действительно, в популяциях василька шероховатого, 12 лет развивавшихся в условиях хронического облучения на территории ВУРС, было выявлено (Кальченко и др., 1996) значимое увеличение частоты встречаемости аллеля S, кодирующего изофермент SOD, с повышенной эффективностью устраняющий активные формы кислорода. Те же авторы обнаружили (Федотов и др., 2006) сильное давление отбора против аллеля F в популяциях сосны обыкновенной, произрастающей в 30-км зоне аварии на ЧАЭС.

Из полученных данных следует, что даже относительно невысокие уровни хронического облучения (7–130 МГр/год) могут приводить к увеличению частоты мутаций в эндоспермах и зародышах семян 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 значимому росту частоты мутаций изоферментных локусов, эффективного числа аллелей, внутривидового разнообразия и частоты редких морф. Таким образом, несмотря на свои низкие значения, наблюдаемые мощности дозы могут рассматриваться как фактор, способный модифицировать генетическую структуру популяций.

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

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Алексахин Р. М., Булдаков Л. А., Губанов В. А.* и др., 2001. Крупные радиационные аварии: последствия и защитные меры. М.: ИздАТ, 752 с.
2. *Алтухов Ю. П.*, 2003. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 431 с.
3. *Антонова Е. В., Позолотина В. Н.*, 2007. Особенности аллозимной структуры ценопопуляций одуванчика в условиях радионуклидного и химического загрязнения // *Экология*. № 5. С. 355–361.
4. *Алтухов Ю. П., Духарев В. А., Животовский Л. А.*, 1983. Отбор против редких электрофоретических вариантов белка и темпы спонтанного мутационного процесса в популяциях // *Генетика*. Т. 19. № 2. С. 264–275.
5. *Волкова П. Ю., Гераськин С. А.*, 2012. Анализ полиморфизма супероксиддисмутазы в хронически облучаемых популяциях сосны обыкновенной // *Радиационная биология. Радиоэкология*. Т. 52. № 4. С. 370–380.
6. *Гераськин С. А., Ванина Ю. С., Дикарев В. Г.* и др., 2009. Генетическая изменчивость в популяциях со-

- сны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 49. № 2. С. 136–146.
7. Гераськин С. А., Дикарева Н. С., Удалова А. А. и др., 2008. Цитогенетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 48. № 5. С. 584–595.
 8. Гераськин С. А., Удалова А. А., Дикарева Н. С. и др., 2010. Биологические эффекты хронического облучения в популяциях растений // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 50. № 4. С. 374–382.
 9. Глазко Т. Т., Архипов Н. П., Глазко В. И., 2008. Популяционно-генетические последствия экологических катастроф на примере Чернобыльской аварии. М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева. 556 с.
 10. Духарев В. А., Коршиков И. И., Рябоконт С. М. и др., 1992. Генетическая дифференциация субпопуляций сосны обыкновенной в условиях техногенного загрязнения // Цитология и генетика. Т. 26. № 3. С. 7–11.
 11. Животовский Л. А., 1991. Популяционная биометрия. М.: Наука. 271 с.
 12. Животовский Л. А., 1984. Интеграция полигенных систем в популяциях. М.: Наука. 184 с.
 13. Кальченко В. А., Калабушкин В. А., Рубанович А. В., 1991. Хроническое облучение как экологический фактор, влияющий на генетическую структуру популяций // Генетика. Т. 27. № 4. С. 676–684.
 14. Кальченко В. А., Рубанович А. В., Шевченко В. А., 1996. Адаптивный характер полиморфизма по локусу супероксиддисмутазы в природных хронически облучаемых популяциях *Centaurea scabiosa* L. // Генетика. Т. 32. № 11. С. 1509–1512.
 15. Карabanь Р. Т., Мишенков Н. Н., Пристер Б. С. и др., 1979. Действие острого гамма-облучения на лесной фитоценоз // Проблемы лесной радиоэкологии. Труды ИПГ. Вып. 38. М.: Гидрометеониздат. С. 27–52.
 16. Козубов Г. М., Таскаев А. И., 1994. Радиобиологические и радиоэкологические исследования древесных растений. СПб.: Наука, 256 с.
 17. Коршиков И. И., Духарев В. А., Котова А. А. и др., 1991. Аллозимный полиморфизм локусов GOT, GDH и SOD у сосны обыкновенной в условиях техногенно загрязнённой среды // Цитология и генетика. Т. 25. № 6. С. 60–64.
 18. Крутовский К. В., Политов Д. В., Алтухов Ю. П. и др., 1989. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // Генетика. Т. XXV. № 11. С. 2009–2032.
 19. Кудряшов Ю. Б., 2004. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: ФИЗМАТЛИСТ. 448 с.
 20. Малецкий С. И., Юданова С. С., 2007. Зародышевый путь и ствольные клетки у высших растений // Цитология и генетика. № 5. С. 67–80.
 21. Полеская О. Г., 2007. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ. 140 с.
 22. Саранульцев Б. И., Гераськин С. А., 1993. Генетические основы радиорезистентности и эволюция. М.: Энергоатомиздат. 208 с.
 23. Созинов А. А., 1985. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука. 272 с.
 24. Спиридонов С. И., Фесенко С. В., Гераськин С. А. и др., 2008. Оценка доз облучения древесных растений в отдалённый период после аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 48. № 4. С. 432–438.
 25. Тихомиров Ф. А., 1972. Действие ионизирующих излучений на экологические системы. М.: Атомиздат. 174 с.
 26. Ульянова Е. В., Позолотина В. Н., Саранульцев И. Е., 2004. Эколого-генетическая характеристика ценопопуляций *Taraxacum officinale* s.l. из пойменных экосистем р. Течи // Экология. № 5. С. 349–357.
 27. Федотов И. С., Кальченко В. А., 2006. Радиационно-генетические последствия облучения популяции сосны обыкновенной в зоне аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 46. № 3. С. 268–278.
 28. Шевченко В. А., Печкуренков В. Л., Абрамов В. И., 1992. Радиационная генетика природных популяций. М.: Наука, 221 с.
 29. Шуйская Е. В., Гисматуллина Л. Г., Тодерич К. Н. и др., 2012. Генетическая дифференциация *Haloxylon aphyllum* (Chenopodiaceae) по градиенту засоления почвы в пустыне Кызылкум // Экология. № 4. С. 284.
 30. Bradshaw A. D., 1991. Genostasis and the limits to evolution // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Vol. 33. P. 289–305.
 31. Elstner E. F., Osswald W., 1994. Mechanisms of oxygen activation during plant stress // Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Biology. Vol. 102B. P. 131–154.
 32. Fisher R. A., 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford: Clarendon Press, 145 p.
 33. Foyer C. H., Noctor G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis: a molecular approach // New Phytologist. Vol. 146. P. 359–388.
 34. Geraskin S. A., Oudalova A. A., Dikareva N. S. et al., 2011. Cytogenetic damage and reproductive effects in

- Scots pine populations affected by the Chernobyl accident // *Ecotoxicology*. Vol. 20. P. 1195–1208.
35. Gechev S. T., Breusegem F., Stone J. et al., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // *BioEssays*. Vol. 28. P. 1091–1101.
 36. Inze D., Van Montagu M., 1995. Oxidative stress in plants // *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 6. P. 153–158
 37. Ipatyev V., Bulavik I., Braginsky V. et al., 1999. Forest and Chernobyl: forest ecosystems after the Chernobyl nuclear power plant accident: 1986–1994 // *Journal of Environmental Radioactivity*. Vol. 42. P. 9–38
 38. Manchenko G. P., 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press. 268 p.
 39. Mengoni A., Gonnelli C., Galardi F. et al., 2000. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L.: a random amplified DNA analysis // *Molecular ecology*. Vol. 9. P. 1319–1324.
 40. Muller L., Vangronsveld J., Colpaert J., 2007. Genetic structure of *Suillus leteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats // *Molecular ecology*. Vol. 16. P. 4728–4737.
 41. Nei M., 1972. Genetic distance between populations // *Amer. Natur.* Vol. 106, N 949. P. 283–292.
 42. Ramzaev V., Botter-Jensen L., Thompsen K. J. et al., 2008. An assessment of cumulative external doses from Chernobyl fallout for a forested area in Russia using optically stimulated luminescence from quartz inclusions in bricks // *J. Environ. Radioactivity*. Vol. 99. P. 1154–1164.
 43. Slomka A., Sutkowska A., Szczepaniak M. et al., 2011. Increased genetic diversity of *Viola tricolor* L. in metal-polluted environments // *Chemosphere*. Vol. 83. P. 435–442.
 44. Sparrow A. H., Rogers A. F., Schwemmer S. S., 1968. Radiosensitivity studies with woody plants // *Radiat. Botany*. Vol. 8. P. 149–186.
 45. Tausz M., Sircelj H., Grill D., 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid // *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55. N 404. P. 1955–1962.
 46. Theodorakis C. W., 2001. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment // *Ecotoxicology*. Vol. 10. P. 245–256.
 47. Whitham T. G., Bailey J. K., Schweitzer J. A. et al., 2006. A framework for community and ecosystem genetics: From genes to ecosystems // *Nature Reviews Genetics*. Vol. 7. P. 510–523.
 48. Wooley S. C., Wimp G. M., 2006. Community and ecosystem genetics: a framework for integrating from genes to ecosystems // *Nature Reviews Genetics*. Vol. 7. P. 510–523.
- ENZYME POLYMORPHISM OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN CHRONICALLY IRRADIATED SCOTS PINE POPULATIONS**
- Volkova P. Y., Geraskin S. A.
- ✿ **SUMMARY: Background.** The Chernobyl accident caused dramatic and long-term increases in ambient radiation doses to many forest environments. Sites still exist in the Bryansk region of Russia, 25 years after the Chernobyl accident, where radioactive contamination significantly exceeds background. There is growing evidence that effects of chronic radiation exposure lead to population-level impacts. Isozymes polymorphism assessment is thought to be promising since it sensitive enough, may integrate the impacts of harmful agents in the environment, and provide meaningful information on biological damage. The aims of this study were to examine whether Scots pine trees have experienced stress in areas with relatively low levels of radioactive contamination and, if so, to quantify such an impact. **Materials and methods.** Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), the dominant tree species in North Eurasia boreal forests, was chosen as a test organism for an assessment of the possible effects from the radioactive contamination. Four study sites were chosen in the most contaminated areas of the Bryansk region of Russia. This area was significantly contaminated by Chernobyl fallout with an initial ¹³⁷Cs ground deposition level more than 1 MBq/m² in some locations (Ramzaev et al., 2008). Sites are uniform in climate and the physical and chemical properties of soils, forest stand is homogeneous, and pine trees occupy a large part of phytocenosis. Dose rates at the study sites ranged from 0.37 to 1.21 μGy/h, compared to 0.10 μGy/h at control site. Pine cones were collected in December of 2009–2010. Specific activities of radionuclides in soil samples were measured, and doses to the pine trees' generative organs were estimated. Antioxidant enzymes polymorphism (superoxide dismutase (SOD, KF 1.15.1.1), glutathione reductase (GR, KF 1.6.4.2), and glutathione peroxidase (GPX, KF 1.11.4.2)) was investigated by vertical electrophoresis. **Results.** The study sites did not differ substantially in soil properties, or chemical content of soil or pine cones (Geras'kin et al., 2011; Geras'kin et al, 2008). The main contribution to the radioactive contamination was from ¹³⁷Cs with activity concentrations at the contaminated sites (averaged through 0–15 cm soil layer) ranging from 2.4 to 56.3 kBq/kg of soil. These activity concentrations exceed those at the referent site by factors of 47–1081 (Geras'kin et al., 2011). Annual absorbed doses rates changes from 7.0 to 130 mGy/year compared to 0.14 mGy/year at reference site. The average frequency of mutations in three enzymes significantly ($r = 99\%$, $p < 0.01$) increases with increasing absorbed dose by generative plant organs. Indices of phenotypic diversity in the populations studied are significantly different from the control. Proportion of rare morphs dramatically increases in populations inhabiting areas contaminated with radionuclides, which is associated with the emergence of new alleles in several enzyme systems (null alleles, allele 0.80 in the GPX-1 and 0.95 in the GPX-2). The observed and expected heterozygosity in affected populations increase along with the level of contamination sites ($r = 99\%$, $p < 0.01$). **Conclusions.** These data show that chronic, low level radiation exposure (7–130 mGy/year) results in an increase in frequency of mutations in the endosperm and the seed embryos and modify the genetic structure of

Scots pine populations. These data suggest that a high level of mutations occurs in the progeny of these pine populations and that their diversity is conditioned by radiation exposure. Thus, in spite of their low values, dose rate observed can be considered as a factor capable of modifying the genetic structure of populations.

✿ **KEY WORDS:** Scots pine; Chernobyl accident; radioactive contamination; chronic irradiation; isozymes; genetic variability; rare morphs; null-alleles.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

- Aleksahin R. M. et al. *Kрупные радиационные аварии: последствия и защитные меры* [Large radiation accidents: consequences and protective measures]. Moscow, 2001. 752 p.
- Altukhov Y. P. *Geneticheskie protsessy v populatsiyah* [Genetic processes in the populations]. Moscow, 2003. 431 p.
- Altukhov Y. P., Dukhaver V. A., Zhivotovsky L. A. *Genetics*. 1983. Vol. 19 (2). P. 264–275.
- Antonova E. V., Pozolotina V. N. *Ecology*. 2007. Vol. 5. P. 355–361.
- Bradshaw A. D. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1991. Vol. 33. P. 289–305.
- Dukharev V. A., Korshikov I. I., Ryabokon' S. M. et al. *Cytology and Genetics*. 1992. Vol. 26 (3). P. 7–11.
- Elstner E. F., Osswald W. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Biology*. 1994. Vol. 102B. P. 131–154.
- Fedotov I. S., Kal'chenko V. A. *Rad. Biology. Radioecology*. 2006. Vol. 46 (3). P. 268–278.
- Fisher R. A. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon Press, 1930. 145 p.
- Foyer C. H., Noctor G. *New Phytologist*. 2000. Vol. 146. P. 359–388.
- Gechev S. T., Breusegem F., Stone J. et al. *BioEssays*. 2006. Vol. 28. P. 1091–1101.
- Geras'kin S. A., Vanina Y. S., Dikarev V. G. et al. *Rad. Biology. Radioecology*. 2009. Vol. 49 (2). P. 136–146.
- Geras'kin S. A., Dikareva N. S., Oudalova A. A. et al. *Rad. Biology. Radioecology*. 2008. Vol. 48 (5). P. 584–595.
- Geras'kin S. A., Oudalova A. A., Dikareva N. S. et al. *Ecotoxicology*. 2011. Vol. 20. P. 1195–1208.
- Geras'kin S. A., Oudalova A. A., Dikareva N. S. et al. *Rad. Biology. Radioecology*. 2010. Vol. 50 (4). P. 374–382.
- Glazko T. T. et al. *Populyatsionno-geneticheskie posledstviya ekologicheskikh katastrof na primere Chernobyl'skoi аварии* [Population and genetic consequences of ecological disasters on the example of Chernobyl accident]. Moscow, 2008. 556 p.
- Inze D., Van Montagu M., *Current Opinion in Biotechnology*. 1995. Vol. 6. P. 153–158.
- Ipatyev V., Bulavik I., Braginsky V. et al. *J. of Env. Radioactivity*. 1999. Vol. 42. P. 9–38.
- Kal'chenko V. A., Kalabushkin V. A., Rubanovich A. V. *Genetics*. 1991. Vol. 27 (4). P. 676–684.
- Kal'chenko V. A., Rubanovich A. V., Shevchenko V. A. *Genetics*. Vol. 32 (11). P. 1509–1512.
- Karaban' R. T., Mishenkov N. N., Prister B. S. et al. *Problems of forest radioecology*. 1979. Vol. 38. P. 27–52.
- Kozubov G. M., Taskaev A. I. *Radiobiologicheskie i radioecologicheskie issledovaniya dreveshykh rastenii* [Radioecological and radiobiological studies of tree plants]. St. Petersburg, 1994. 256 p.
- Korshikov I. I., Dukharev V. A., Kotova A. A. et al. *Cytology and Genetics*. 1991. Vol. 25 (6). P. 60–64.
- Krutovsky K. V., Politov D. V., Altukhov Y. P. et al. *Genetics*. 1989. Vol. 25 (11). P. 2009–2032.
- Kudryashov Y. B. *Radiatsionnaya biofizika (ionioziruyushchie izlucheniya)* [Radiation biophysics (ionizing radiation)]. Moscow, 2004. 448 p.
- Maletskiy S. I., Yudanov S. S. *Cytology and Genetics*. 2007. Vol. 5. P. 67–80.
- Manchenko G. P. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. CRC Press. 1994. 268 p.
- Mengoni A., Gonnelli C., Galardi F. et al. *Molecular ecology*. 2000. Vol. 9. P. 1319–1324.
- Muller L., Vangronsveld J., Colpaert J. *Molecular ecology*. 2007. Vol. 16. P. 4728–4737.
- Nei M. *Amer. Natur.* 1972. Vol. 106, № 949. P. 283–292.
- Poleskaya O. G. *Rastitel'naya kletka i aktivnye formy kisloroda* [Plant cell and reactive oxygen species]. Moscow, 2007. 140 p.
- Ramzaev V., Botter-Jensen L., Thompsen K. J. et al. *J. Env. Radioactivity*. 2008. Vol. 99. P. 1154–1164.
- Sarapultsev B. I., Geras'kin S. A. *Geneticheskie osnovy radiorezistentnosti i evolucii* [Genetic basis of radioresistance and evolution]. Moscow, 1993. 208 p.
- Shevchenko V. A. et al. *Radiatsionnaya genetika prirodnykh populyatsiy* [Radiation genetics of natural populations]. Moscow, 1992. 221 p.
- Shuyskaya E. V., Gismatullina L. G., Toderich K. N. et al. *Ecology*. 2012. Vol. 4. P. 284.
- Sozinov A. A. *Polymorfizm belkov i ego znachenie v genetike i selekcii* [Polymorphism of proteins and its importance in genetics and selection]. Moscow, 1985. 272 p.
- Slomka A., Sutkowska A., Szczepaniak M. et al. *Chemosphere*. 2011. Vol. 83. P. 435–442.
- Sparrow A. H., Rogers A. F., Schwemmer S. S. *Radiat. Botany*. 1968. Vol. 8. P. 149–186.
- Spiridonov S. I., Fesenko S. V., Geras'kin S. A. et al. *Rad. Biology. Radioecology*. 2008. Vol. 48 (4). P. 432–438.
- Tausz M., Sircelj H., Grill D. J. *Experimental Botany*. 2004. Vol. 55. № 404. P. 1955–1962.
- Theodorakis C. W. *Ecotoxicology*. 2001. Vol. 10. P. 245–256.

42. Tikhomirov F.A. *Deystvie ioniziruyuschikh izlucheniya na ekologicheskie sistemy* [Effects of ionizing radiation on ecosystems]. Moscow, 1972. 174 p.
43. Ul'yanova E. V., Pozolotina V.N., Sarapultsev I. E. *Ecology*. 2004. Vol. 5. P.349–357.
44. Volkova P.Y., Geras'kin S. A. *Rad. Biology. Radioecology*. 2012. V. 52 (4). P.370–380.
45. Whitham T. G., Bailey J. K., Schweitzer J. A. et al. *Nature Reviews Genetics*. 2006. Vol. 7. P. 510–523.
46. Wooley S. C., Wimp G. M. *Nature Reviews Genetics*. 2006. Vol. 7. P. 510–523.
47. Zhivotovsky L. A. *Populyatsionnaya biometriya* [Population biometrics]. Moscow, 1991. 271 p.
48. Zhivotovsky L. A. *Integratsiya poligennykh system v populyatsiyakh* [Integration of polygenic systems in the populations]. Moscow, 1984. 184 p.

☛ Информация об авторах

Волкова Полина Юрьевна — м. н. с., лаборатория экотоксикологии и радиобиологии растений. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии (ГНУ ВНИИСХРАЭ Россельхозакадемии). 249030, Обнинск, Киевское шоссе, 109 км. E-mail: volkova.obninsk@gmail.com.

Гераськин Станислав Алексеевич — д. б. н., профессор, заведующий лабораторией экотоксикологии и радиобиологии растений. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии (ГНУ ВНИИСХРАЭ Россельхозакадемии). 249030, Обнинск, Киевское шоссе, 109 км. E-mail: stgeraskin@gmail.com.

Volkova Polina Yuryevna — Resercher, Laboratory for ecotoxicology and radiobiology of plants. Russian Institute of Agricultural Radiology and Agroecology. 249030, Obninsk, Kiyevskoye shosse, 109 km. Russia. E-mail: volkova.obninsk@gmail.com.

Geraskin Stanislav Alekseyevich — MD, Professor, Head of Laboratory for ecotoxicology and radiobiology of plants. Russian Institute of Agricultural Radiology and Agroecology. 249030, Obninsk, Kiyevskoye shosse, 109 km. Russia. E-mail: stgeraskin@gmail.com.