

Академик Н. П. ДУБИНИН, Ю. П. АЛТУХОВ, Е. А. САЛМЕНКОВА,
А. Н. МИЛИШНИКОВ, Т. А. НОВИКОВА

АНАЛИЗ МОНОМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ МУТАГЕННОСТИ СРЕДЫ

При выявлении мутагенной активности факторов окружающей среды главное внимание уделяется созданию чувствительных тест-систем. На этом пути возможна оценка индивидуальных мутагенов, однако надо учитывать, что мутагенные эффекты в биосфере имеют комплексный характер и реализуются на популяционном уровне. Решение вопроса требует непосредственного интегрального анализа популяционно-генетических процессов, возникающих под влиянием загрязнения биосферы ⁽¹⁾.

Несмотря на всю очевидность такого подхода, его практическое осуществление не так просто, как может показаться на первый взгляд. Ни один из существующих приемов регистрации мутаций не может быть признан удовлетворительным для оценки особенностей мутационного процесса в природных популяциях.

Для разработки универсального сравнительного подхода к выявлению груза индуцированных мутаций необходимо: 1) исследовать достаточно большую совокупность генов, разных по локализации и функции; 2) проводить анализ на уровне кодоминантных гомологичных генов; 3) уметь отличать мутационный груз от сегрегационного. Эти задачи могут быть решены лишь методами молекулярной и биохимической генетики, например, при электрофоретическом исследовании белков. Электрофоретические варианты белка кодируются аллельными генами, наследующимися, как правило, кодоминантно, и возможно одновременное изучение многих генов, гомологичных для широкого круга организмов — от бактерий до человека. Принципиально важно то, что наряду с полиморфными белковыми системами в популяциях обнаруживаются генетически мономорфные белки, не показывающие обычной индивидуальной изменчивости ⁽²⁻⁴⁾. При их исследовании на всем видовом ареале удастся обнаружить лишь редкие варианты, встречающиеся с частотой, не превышающей вероятность повторного мутирования ^(5, 6). Именно наблюдение за группой мономорфных белков и, более широко, за всем фондом редких электрофоретических вариантов, позволяет исследовать мутационный процесс в бисексуальной природной популяции так же надежно, как если бы в качестве объектов были взяты клоны или чистые линии.

Цель настоящей статьи — экспериментально показать возможность такого подхода на примере гиногенетических однополых популяций одного из видов рыб — серебряного карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch.), обитающего в специальных водоемах, экспериментально загрязненных радиоактивными изотопами.

Работа выполнена в 1972–1974 гг. Были изучены выборки из шести изолированных водоемов, два из которых представляют собой контрольные (№ 1 и 2) и четыре (№ 3–6) — опытные, отличающиеся друг от друга и от контрольных концентрациями внесенных в них радионуклидов стронция-90 и цезия-137 (табл. 1). Выбор объекта не был случайным и диктовался следующими обстоятельствами, важными для понимания сути подхода и оценки полученных результатов.

Во-первых, развитие у однополых формы серебряного карася идет по амеиотическому типу ⁽⁷⁾, потомство отдельной самки представляет собой клоны — совокупность генетически тождественных индивидуумов. Во-вторых, есть основания утверждать, что изолированные популяции этого вида ведут

Таблица 1

Радиоэкологические и генетические особенности изученных популяций

Водоем, №	Концентрация радионуклидов, С/л · 10 ⁻¹¹		Число исследо- ванных рыб	Параметры, характеризующие генетическое разнообразие		
	⁹⁰ Sr	¹³⁷ Cs		Общее число электрофорети- ческих вариан- тов белка	Общее число новых и редких вариантов **	Информационная мера разнообра- зия, H ± s.e.
1	2	3	4	5	6	7
1	*	*	73	43	5	4,8 ± 0,20
2	1,0	0,08	75	36	1	2,9 ± 0,16
3	3	4,0	77	57	19	8,8 ± 0,23
4	2,2	1,5	76	47	15	6,0 ± 0,25
5	230	3,0	152	62	24	9,7 ± 0,18
6	700	2,5	137	56	20	9,0 ± 0,15

* Уровни примерно те же, что и в водоеме № 2.

** Белковые варианты, редкие ($q \leq 0,05$) или вообще не встречающиеся в контрольных популяциях.

свое начало, как правило, от одной или немногих особей («принцип основателя»), и, следовательно, генетическая изменчивость в таких популяциях в основном должна быть мутационного происхождения — в чистых водоемах вследствие спонтанного мутагенеза, а в загрязненных — еще и за счет мутаций, индуцированных радионуклидами *. Таким образом, выбранная нами схема опыта представляет как бы модель выявления груза индуцированных мутаций в бисексуальной популяции на основе анализа одних лишь мономорфных белков.

Методами электрофореза в сочетании с гистохимическим окрашиванием на энзиматическую активность по схеме, подробно описанной ранее (⁴), у каждой особи исследована генетическая изменчивость следующих белков: малатдегидрогеназы (МДГ; КФ: 1.1.1.37) мышц и сыворотки; эстеразы (Эст; КФ: 3.1.1.) мышц и сыворотки; алкогольдегидрогеназы (АДГ, КФ: 1.1.1.1) мышц; аспартатаминотрансферазы (ААТ; КФ: 2.6.1.1) мышц; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ: 1.1.1.49) хрусталика; каталазы (Кат; КФ: 1.11.1.6) мышц; лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ: 1.1.1.27) хрусталика; «кристаллинов» — водорастворимых белков хрусталика глаза, и «миогенов» — водорастворимых белков мышц; всего 11 белковых систем, кодируемых предположительно 28 генетическими локусами.

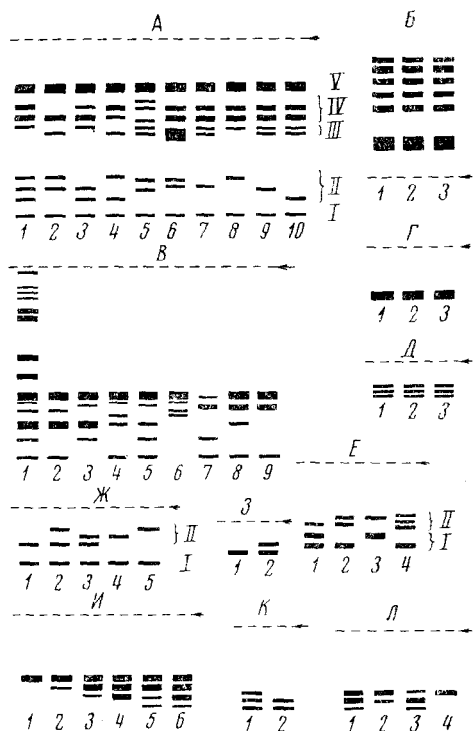
На рис. 1 видим, что для большинства изученных белков характерна сильная изменчивость, они представлены значительным числом типов (от 2 для Г-6-ФДГ до 9 для одного из локусов Эст), и лишь ААТ, ЛДГ и кристаллины не показали вариаций в изученных выборках.

Что же касается других белковых систем, то по ним между опытными и контрольными популяциями, в полном соответствии с ожиданием, прослеживаются ясные различия: если взять в качестве меры разнообразия популяции общее число электрофоретических вариантов, то его статистически значимое увеличение регистрируется уже для группы «промежуточных» водоемов (№ 3, 4) с незначительной концентрацией внесенных радионуклидов. В максимально загрязненных водоемах это разнообразие еще больше.

Разумеется, концентрация радиоизотопов в воде, особенно с учетом различий между водоемами по химическому составу, не может быть связана прямой пропорциональной зависимостью с дозой, полученной генеративными тканями рыбы. Кроме того, необходимо учитывать, что указанные в таблице концентрации изотопов не отражают в полной мере той радиа-

* В этих водоемах после внесения в них радиоизотопов сменилось не менее четырех последовательных поколений.

Рис. 1. Схематическое изображение электрофоретических вариантов белков, обнаруженных в популяциях серебряного карася: *A* — Эст мышц; *B* — кристаллины; *B* — миогены (в группе более медленных фракций (см. № 1), некоторые зоны инвариантны во всех популяциях, другие же разделяются недостаточно четко, поэтому данную группу белков мы здесь не рассматриваем); *Г* — ААТ; *Д* — ЛДГ; *Е* — Эст сыворотки; *Ж* — Кат; *З* — Г6ФД; *И* — АДГ; *К*, *Л* — МДГ сыворотки и мышц соответственно. На всех схемах анод снизу, катод сверху; пунктирная линия показывает стартовую позицию, 1–10 — различные электрофоретические типы, встреченные в выборке



ционной обстановки, с которой популяции столкнулись в первое время после внесения радионуклидов в водоем. Тем не менее между содержанием в водоемах цезия-137 и всеми параметрами, характеризующими разнообразие популяций (табл. 1), прослеживается достоверная положительная корреляция ($r_{3.5}=0,909$, $P<0,05$; $r_{3.6}=0,875$, $P<0,05$; $r_{3.7}=0,909$, $P<0,05$) *. Значимая на 95% уровне связь наблюдается и между логарифмом общей концентрации радиоизотопов и теми же характеристиками разнообразия.

На рис. 2 различие между опытными и контрольными водоемами показано в виде графиков-полигонов, представляющих некий обобщенный облик популяций, характеризующихся по информационной мере разнообразия (верхний ряд) и по числу электрофоретических белковых вариантов, которые редки или отсутствуют в контроле (нижний ряд).

В общем, при сравнении опытных и контрольных водоемов можно отметить следующие особенности.

1. Редкие варианты, обнаруживаемые в контрольных водоемах и отражающие давление спонтанных мутаций (например, тип 1 Эст-III; тип 3 Кат; тип 3 МДГ мышц и др., см. рис. 1), поднимаются до высоких концентраций в отдельных опытных водоемах — следствие давления индуцированных мутаций и (или) отбора.

2. В опытных водоемах обнаруживаются новые варианты (например, тип 5 Эст-IV и тип 6 Эст-III, типы 6–9 миогенов и др., рис. 1), диапазон их частот также указывает на давление мутаций и, возможно, отбора.

Особенно ясным свидетельством усиления мутационного процесса в подопытных популяциях служит заметное увеличение в них доли белковых вариантов, встречающихся на низких частотах (45% против 30% в контрольных водоемах: $\chi^2=19,2$; $P<0,01$).

Таким образом, выполненное исследование устанавливает четкую дивергенцию сравниваемых популяций, которая в значительной мере обусловлена мутационным процессом, индуцированным радионуклидами, внесенными в водоемы. Принимая, что все разнообразие в контрольных

* Индексы у коэффициентов корреляции r соответствуют номерам граф в табл. 1.

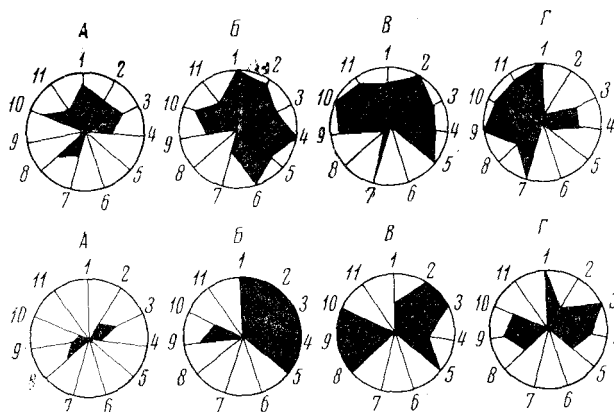


Рис. 2. Графическое изображение биохимического разнообразия исследованных популяций. А — водоемы № 1 и № 2 суммарно; Б — водоемы № 3 и № 4 суммарно; В — водоем № 5, Г — водоем № 6. Суммарные данные приведены с целью уравнивать объемы сравниваемых выборок (см. табл. 1). На радиусах отложены значения соответствующих показателей разнообразия в данной популяции в долях от его максимальной величины (100%) в любой другой популяции. Ноль в центре круга. Цифры означают следующие белки: 1 — АДГ; 2—5, 8 — различные зоны Эст; 6 — МДГ сыворотки; 7 — Г6ФД; 9 — Кат; 10 — МДГ мышц; 11 — многены. Остальные объяснения в тексте

водоемах в основном отражает темп спонтанного мутирования, можно оценить давление индуцированных мутаций. Простые расчеты, при условии нейтральности мутаций, показывают, что в водоемах с промежуточным и максимальным уровнями радиоактивного загрязнения скорость мутирования в среднем на locus на поколение составляет 10^{-3} — 10^{-2} . Если принять частоту мутирования для генов, кодирующих синтез ферментных и неферментных белков $\sim 10^{-5}$ ($8-10$), то это означает возрастание темпа мутирования по крайней мере на 2—3 порядка.

Возможно, в дальнейшем придется внести некоторые поправки к полученным конкретным оценкам. Вместе с тем уже сейчас экспериментально доказано, что проблема мониторинга мутаций, возникающих от загрязнения среды мутагенами, надежнее всего может решаться при анализе интегральных эффектов в самих популяциях, изучаемых с позиций и методами биохимической генетики. Усовершенствование этих методов обещает еще больше расширить возможности обосновываемого нами подхода, приложимого к любым видам. Особенное значение этот подход может иметь для оценки вклада индуцированного мутагенеза в динамику генетического груза в популяциях человека *.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. П. Дубинин, Эволюция популяций и радиация, М., Атомиздат, 1966.
- ² Ю. П. Алтухов и др., Реф. науч. работ Ин-та биологии моря АН СССР, 1967—1968, Владивосток, т. 1, 1969, стр. 19. ³ Ю. А. Алтухов, ДАН, т. 184, 857 (1969).
- ⁴ Ю. П. Алтухов и др., Генетика, т. 8, 251 (1972). ⁵ Ю. А. Алтухов, Популяционная генетика рыб, М., «Пищевая промышленность», 1974. ⁶ Ю. А. Алтухов, Ю. Г. Рычков, Журн. общ. биол., т. 33, 281 (1972). ⁷ Н. Б. Черфас, Генетика, т. 2, 16 (1966). ⁸ T. Mukai, Drosophila Inform. Serv., v. 45, 99 (1970). ⁹ Y. Tobari, K. Kojima, Genetics, v. 70, 397 (1972). ¹⁰ J. Neel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 3311 (1973). ¹¹ J. Neel, Mut. Res., v. 26, 319 (1974).

* Когда настоящая работа была подготовлена к печати, нам стала известна статья Дж. Пила (¹¹), в которой в общей форме обсуждается значение редких электрофоретических вариантов белка в связи с проблемой оценки увеличения темпов мутационного процесса у человека.