

Н.В. ТРЯПИЦЫНА, В.И. ГЛАЗКО

Институт агроэкологии и биотехнологии УААН,  
ул. Метрологическая, 12, Киев

**ПОЛИМОРФИЗМ ФРАГМЕНТОВ  
ДНК, ФЛАНКИРОВАННЫХ  
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ  
ЛОКУСАМИ (ISSR-PCR)  
У ВОСПРОИЗВОДЯЩЕГОСЯ  
В УСЛОВИЯХ НИЗКОДОЗОВОГО  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**



*Исследовано воспроизведение генетической структуры группы черно-пестрого голштиinizированного скота, воспроизводящегося в хозяйстве «Новошепеличи» в 10-км зоне отчуждения Чернобыльской АЭС в условиях хронического действия низкодозового излучения в родительском поколении  $F_0$  и в двух дочерних поколениях  $F_1$  и  $F_2$ . Проведен анализ полиморфизма и наследования аллельных вариантов фрагментов ДНК, фланкированных инвертными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR). Выявлены увеличение уровня расчетной гетерозиготности в поколении  $F_2$  и отсутствие в двух дочерних поколениях  $F_1$  и  $F_2$  изменений размаха генетической изменчивости по сравнению с поколением  $F_0$ , определяемой долей полиморфных локусов. Не обнаружено новых амплификационных фрагментов, появление которых можно было бы расценивать как мутационное событие.*

© Н.В. ТРЯПИЦЫНА, В.И. ГЛАЗКО, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 5

**Введение.** Исследование генетической ситуации, возникшей в сообществах организмов в связи с Чернобыльской катастрофой, в целях долгосрочных прогнозов популяционно-генетических изменений требует решения ряда задач, среди которых главными являются, с одной стороны, подбор индикаторных видов, удобных для экстраполяции на популяции человека, с другой — подбор маркерных систем, отвечающих таким требованиям, как высокий уровень полиморфизма, стабильность воспроизведения, доступность и простота использования.

Эффект воздействия на организм хронического ионизирующего излучения интенсивно исследуется. Имеются данные об увеличении количества мутаций в половых клетках мышей под воздействием ионизирующего излучения [1–3]. Методы выявления мутаций в этих исследованиях базировались на использовании высокомутабельных минисателлитных локусов. С использованием этого же метода было продемонстрировано некоторое увеличение уровня мутаций в генеративных клетках в семьях, проживающих на загрязненных территориях Белоруссии [4]. В то же время исследования минисателлитных локусов у детей, родившихся от родителей, которые пережили катастрофу в Хиросиме и Нагасаки, не привели к выявлению значительного увеличения уровня мутаций [5, 6]. Позднее у детей ликвидаторов Чернобыльской аварии на основании оценок полиморфных фрагментов ДНК, фланкированных инвертными повторами (RAPD-PCR, ISSR-PCR), в спектрах амплификации было отмечено появление отсутствующих у их родителей фрагментов ДНК, расцененное авторами как мутационные наследуемые события [7].

В наших исследованиях с целью выявления генотоксических эффектов хронического действия низкодозового излучения выполнен сравнительный анализ генетической структуры разных поколений крупного рогатого скота экспериментального хозяйства «Новошепеличи». Родительское поколение было представлено тремя коровами и одним быком, родившимися до Чернобыльской аварии, и пятью коровами, родившимися в хозяйстве «Куповатое», относительно «чистом» в отношении радионуклидного загрязнения. Эти животные рассматривались как контроль по отношению к их потомству, родившемуся в условиях радиоактивного загрязнения (2000 Ки/км<sup>2</sup>) в экспе-

риментальном хозяйстве «Новошепеличи» в 10-км зоне отчуждения Чернобыльской АЭС. В работе был выполнен сравнительный анализ полиморфизма и наследования фрагментов ДНК, фланкированных инвертными микросателлитными повторами (ISSR-PCR). Этот тип молекулярно-генетических маркеров был выбран в связи с известным высоким уровнем полиморфизма полилокусных спектров продуктов амплификации, выявляемых данным методом, у разных видов [8—11].

Рассмотренная группа животных имела ряд преимуществ: наличие трех последовательных поколений, родившихся после Чернобыльской катастрофы в условиях зоны отчуждения, доступность биологического материала родителей и потомков, а также более близкое сходство по синтении между крупным рогатым скотом и человеком, чем между человеком и мышью. Принимая все это во внимание, считаем, что экспериментальное стадо хозяйства «Новошепеличи» является уникальной моделью для изучения и прогнозирования возможных отдаленных популяционно-генетических последствий хронического действия низкодозового ионизирующего излучения на животных и человека.

Широкая представленность микросателлитной ДНК в геномах эукариот [12], а также высокая степень подверженности мутационным событиям микросателлитных локусов, которая в зависимости от нуклеотидных мотивов и места локализации оценивается в  $10^{-2}$ — $10^{-5}$  мутаций на гамету на одно поколение [13], позволяет предполагать высокую чувствительность ISSR-PCR маркеров к индукции мутационных событий. Благодаря многочисленным сайтам амплификации, рассеянным по всему геному, метод позволяет получать мультилокусные спектры. Высокая температура отжига и длина праймеров в 19—23 нуклеотида обеспечивает методу необходимую воспроизводимость.

**Материалы и методы.** Семейный анализ выполнялся в группе черно-пестрого голштинизированного скота, воспроизводящегося в экспериментальном хозяйстве «Новошепеличи» в 10-км зоне отчуждения Чернобыльской атомной станции. Группа представлена 8 семьями, три из которых берут начало от животных, пе-

реживших катастрофу в этой же местности (коровы Альфа, Бета и Гамма), остальные пять — от черно-пестрого голштинизированного скота, завезенного в экспериментальное хозяйство в 1990—1992 гг. из относительно «чистого» (<5 Ки/км<sup>2</sup>) полесского хозяйства «Куповатое». Всего обследовано 34 животных (табл. 1), воспроизводящихся в условиях хронического действия низкодозового излучения. Все животные, за исключением Альфы, Беты, Гаммы и завезенных пяти полесских коров с идентификационными номерами 6803, 6824, 6827, 6843 и 4789, являющихся родоначальницами семей, происходят от одного производителя — быка Урана, также пережившего катастрофу в этой же местности.

Получение мультилокусных амплификационных спектров основывалось на использовании методики, предложенной Zietkiewicz et al. [14]. Исходным материалом для исследований были образцы крови (лейкоциты). Кровь для исследования брали из яремной вены животных в пробирки с гепарином (из расчета 25 МЕ на 1 мл крови). Ядерную ДНК из крови выделяли по следующей методике: к 200 мкл гепаринизированной цельной крови добавляли 1 мл деионизированной воды и подвергали образец замораживанию—оттаиванию. Затем проводили центрифугирование при 7000 об/мин в течение 5 мин в центрифуге Eppendorf. Супернатант сливали. Повторяли процедуру до тех пор, пока осадок не становился бесцветным. После этого осадок суспендировали в 500 мкл буфера СТАБ, содержащего 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1,4 М NaCl и 2 % СТАБ. Образец инкубировали 2 ч при 56 °С. Затем смесь дважды экстрагировали равным объемом хлороформа. Из водной фазы ДНК преципитировали 2,5 объемами 96%-ного спирта. Образец выдерживали 15—20 мин при –20 °С, после чего центрифугировали 15 мин при 14 000 об/мин. Осадок ДНК промывали 70 % этанолом, подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 100 мкл деионизированной воды.

Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ каждого dNTP, 2 мкМ праймера, 1 ед. акт. Таq ДНК полимеразы и 50—100 нг геномной ДНК. Ус-

Клички и идентификационные номера исследованных животных

Поколение	Семья								
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я	<i>n</i>
F <sub>0</sub>	Альфа	Бета	Гамма	6824	6843	6827	4789	6803	8+Уран
F <sub>1</sub>	Роза	49	15	7	160	166	169	170	12
					2	4777		118	
						42			
F <sub>2</sub>	41	113	99	161	179			174	12
	11	137	100						
		172	81						
		178							
F <sub>3</sub>		175							1

Примечание. F<sub>0</sub> — поколение родителей, рожденных до Чернобыльской катастрофы (8 коров и бык Уран), F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> — три поколения потомков, рожденных в зоне отчуждения ЧАЭС.

ловия PCR для динуклеотидных праймеров включали начальную денатурацию при 95 °С — 4 мин и последующие 37 циклов: 95 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 2 мин 30 с. Конечный синтез 72 °С — 7 мин. Для тринуклеотидных праймеров использовались те же условия амплификации, за исключением более высокой температуры отжига — 58 °С.

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали под УФ-лучами.

Для определения размеров продуктов амплификации на каждом блоке использовали маркер молекулярных масс Step Ladder DNA S7025 (Sigma). Весь спектр полученных ампликонов подразделяли на зоны, отличающиеся на 100 пар нуклеотидов, и в этих пределах условно обозначали ампликоны, отличающиеся друг от друга примерно на 25 пар нуклеотидов. Для удобства сравнения спектров продуктов амплификации (ампликонов) выделяли три интервала в зависимости от молекулярной массы ампликонов: I интервал включал ампликоны с молекулярной массой менее и равные 1000 п.н., II — от 1000 до 2000 п.н. и равные 2000 п.н., III — свыше 2000 п.н.

При проведении семейного анализа исходили из предположения о менделевском распределении в потомстве фланкированных аллельных вариантов фрагментов анонимной ДНК микросателлитными локусами. Каждый продукт амплификации в спектре рассматри-

вался как присутствие доминантного аллеля в отдельном локусе, соответственно отсутствие фрагмента учитывали как гомозиготу по рецессивному аллелю.

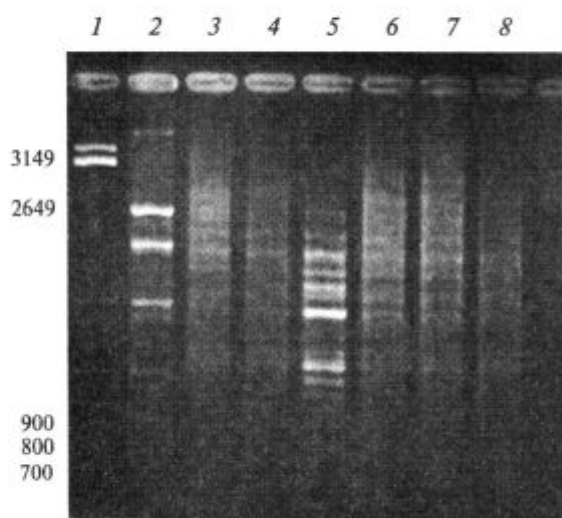
Расчетную гетерозиготность каждого локуса определяли путем сравнения спектров ампликонов в родительском и дочерних поколениях по присутствию (+) или отсутствию (–) доминантного аллеля локуса. Когда присутствие ампликона, соответствующее доминантному аллелю локуса, не варьировало в поколениях, этот локус оценивали как гомозиготный по присутствию (+). Отсутствие ампликона рассматривали как гомозиготное состояние локуса по рецессивному аллелю (–). Корова, в спектре которой присутствовал ампликон, соответствующий доминантному аллелю локуса, считалась гетерозиготной по данному локусу, если среди ее потомков в следующем поколении были выявлены животные-гомозиготы по рецессивному аллелю этого локуса, а также если бык Уран был гомозиготой по рецессивному аллелю данного локуса, а у потомков в следующем поколении отмечалось как присутствие соответствующего ампликона, так и его отсутствие.

Для характеристики уровня генетической изменчивости исследуемой группы животных использовали следующие величины.

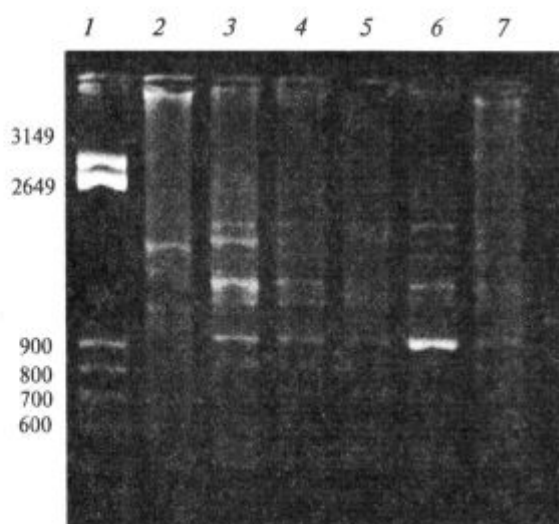
1. Доля полиморфных локусов среди изученных для каждого *j*-го праймера — величина *P<sub>j</sub>*:

$$P_j = k_j/L_j, \quad (1)$$

где *L* — общее количество выявленных про-



a



b

Спектры ампликонов, полученные для семьи Беты с использованием праймеров: *a* — (AGC)<sub>n</sub>G: 1 — маркер, 2 — Уран, 3 — Бета, 4 — 175, 5 — 172, 6 — 49, 7 — 49, 8 — 113; *b* — (ACC)<sub>n</sub>G: 1 — маркер, 2 — Уран, 3 — Бета, 4 — 175, 5 — 113, 6 — 172, 7 — 49

дуктов амплификации для *j*-го праймера,  $k_j$  — количество обнаруженных среди них при семейном анализе полиморфных локусов.

2. Среднюю расчетную гетерозиготность ( $Hc_j$ ) на одну особь для каждого праймера определяли, как сумму гетерозиготных особей по каждому ампликону спектра продуктов амплификации данного праймера (*j*), установленную при семейном анализе и усредненную по количеству локусов (*L*) в спектре *j*-го прай-

мера и на количество животных в рассматриваемом поколении

$$Hc_j = \frac{1}{L} \sum_1^L \frac{Nh}{N}, \quad (2)$$

где *Nh* — количество гетерозиготных особей по каждому продукту амплификации (локусу) в спектре *j*-го праймера, *N* — количество животных в поколении, *L* — количество локусов в спектре *j*-го праймера. Достоверность отличий между поколениями в значениях  $P_j$  и  $Hc_j$  оценивали с использованием критерия достоверности Стьюдента.

3. Выявление в потомстве отклонений от ожидаемого равновероятного наследования аллелей родителей. Наличие доминантного аллеля в гомо- или гетерозиготе у родителей позволяло рассчитать ожидаемую частоту данного аллеля в дочернем поколении ( $f_{ex}$  — expected).

Наблюдаемую частоту доминантного аллеля ( $f_{ob}$  — observed) в каждом *l*-локусе для одного поколения рассчитывали по формуле

$$f_{ob} = \frac{2n_1 + n_2}{2n}, \quad (3)$$

где  $n_1$  — количество гомозиготных животных по доминантному аллелю *l*-локуса (присутствие у отдельной семьи ампликона данной длины у родителей и потомков),  $n_2$  — количество гетерозиготных животных (гетерозиготность выявлялась по отсутствию ампликона данной длины хотя бы у одного животного в исследуемой семье), *n* — общее число исследованных животных в поколении для всех восьми рассмотренных семей.

Частоты доминантных аллелей ( $f_{ex}$ ,  $f_{ob}$ ), рассчитанные для каждого локуса, усредняли по общему количеству выявленных локусов с использованием всех праймеров

$$\bar{f}_{ob,ex} = \frac{1}{L} \sum_1^L f_{ob,ex}, \quad (4)$$

где  $\bar{f}$  — усредненная частота доминантных аллелей для *L* локусов, выявленных с помощью всех праймеров в одном поколении.

Для сравнения поколений по ожидаемым и наблюдаемым частотам аллелей ( $f_{ex}$  и  $f_{ob}$ ) использовали стандартный *t*-критерий Стьюдента попарного сравнения выборок по частоте

там отдельных аллелей

$$t_a = (f_{ex} - f_{ob}) / \sqrt{s_{ex}^2 + s_{ob}^2}, \quad (5)$$

где  $f_{ex}$  и  $f_{ob}$  – ожидаемая и наблюдаемая частоты доминантных аллелей в сравниваемых поколениях,  $s_{ex}^2$  и  $s_{ob}^2$  – их статистические ошибки соответственно.

Статистическую ошибку оценки частоты доминантных аллелей определяли по формуле

$$S_p = \sqrt{f_j(1-f_j)/N}, \quad (6)$$

где  $N$  – общее число аллелей [15].

При сравнении всех перечисленных показателей генетической изменчивости между поколениями проанализированных животных в качестве контроля выступало родительское поколение  $F_0$ .

**Результаты исследований и их обсуждение.** В работе выполнен сравнительный анализ полиморфизма и наследования аллельных вариантов фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертными ди- и тринуклеотидными микросателлитными повторами, которые получены соответственно с использованием трех динуклеотидных и восьми тринуклеотидных микросателлитных праймеров. Примеры продуктов амплификации (ампликонов) представлены на рисунке.

В сумме использование всех микросателлитных праймеров позволило выявить 162 фрагмента ДНК, 134 из которых оказались полиморфными. Диапазон молекулярных масс выявленных ампликонов колебался от минимального в 275 п.н. до максимального в 3200 п.н. Наибольшее количество ампликонов (от 18 до 24) было выявлено с использованием праймеров GT(CAC)<sub>7</sub>, (ACC)<sub>6</sub>G, (AGC)<sub>6</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C из 11 использованных. Среди праймеров лидирующими по выявленной с их помощью доле полиморфных локусов оказались праймеры с коровыми мотивами (СТС)<sub>6</sub> и (САС)<sub>7</sub> (табл. 2).

С помощью таких праймеров, как (AGC)<sub>6</sub>G, (СТС)<sub>6</sub>C, (СТС)<sub>6</sub>A и (САС)<sub>7</sub>A, в группе исследованных животных удалось выявить достоверные отличия по доле полиморфных локусов между всеми тремя исследованными поколениями ( $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ) (табл. 3). В спектрах, полученных с использованием праймеров (AC)<sub>9</sub>G и (GA)<sub>9</sub>C, достоверные отличия этого

Таблица 2

Общее количество выявленных ампликонов в спектре ( $n$ ) и доля всех выявленных полиморфных локусов ( $P$ ), фланкированных различными ди- и тринуклеотидными микросателлитными повторами по всем проанализированным спектрам амплификации

Праймер	$n$	$P$
(AC) <sub>9</sub> G	9	0,777
(GA) <sub>9</sub> C	18	0,777
(CT) <sub>9</sub> G	9	0,555
(AGC) <sub>6</sub> G	13	0,846
(AGC) <sub>6</sub> C	19	0,842
(ACC) <sub>6</sub> G	19	0,842
(СТС) <sub>6</sub> C	14	0,857
(СТС) <sub>6</sub> A	15	0,933
(САС) <sub>7</sub> A	15	0,866
(САС) <sub>7</sub> T	7	0,857
GT(САС) <sub>7</sub>	24	0,833

показателя были выявлены только между поколениями  $F_1$  и  $F_2$ . В целом в поколении  $F_1$  по сравнению с поколением  $F_0$  отмечены достоверные изменения в доле полиморфных локусов для 4 из 11 использованных праймеров, а в поколении  $F_2$  – для 7 праймеров (табл. 3).

Изменения показателя доли полиморфных локусов в поколениях носили разнонаправленный характер и были индивидуальными в спектрах каждого праймера. Выраженность анализируемых изменений также варьировала от праймера к праймеру, что свидетельствует о специфичности ответа в каждом конкретном случае. С целью более дифференцированного анализа изменчивости генетической структуры в поколениях все исследуемые семьи были разделены на две подгруппы: первая подгруппа представлена семьями, берущими начало от коров, которые пережили катастрофу в этой же местности (Альфа, Бета и Гамма), вторая – семьями, берущими начало от коров, которые завезены в экспериментальное хозяйство в 1990–1993 гг. из относительно чистых районов Полесья (коровы с инвентарными номерами 6803, 6824, 6827, 6843 и 4789).

Между двумя подгруппами не было выявлено достоверных различий по доле полиморфных локусов (табл. 4). В сумме по всем использованным праймерам в родительском поколении ( $F_0$ ) так же, как и двух последующих ( $F_1$  и  $F_2$ ), под-

Доли полиморфных локусов (P), выявленных с использованием различных праймеров, в каждом поколении исследуемой группы животных

Праймер	Процент GC	P		
		F <sub>0</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>
(AC) <sub>9</sub> G	52	0,789 ± 0,241	0,434 ± 0,134**	0,633 ± 0,057**
(GA) <sub>9</sub> C	52	0,651 ± 0,041	0,692 ± 0,089***	0,477 ± 0,079***
(CT) <sub>9</sub> G	52	0,035 ± 0,012	0,068 ± 0,051	0,048 ± 0,027
(AGC) <sub>6</sub> G	68	0,361 ± 0,065***	0,689 ± 0,077***	0,733 ± 0,041***
(AGC) <sub>6</sub> C	68	0,574 ± 0,090	0,436 ± 0,211	0,653 ± 0,057
(ACC) <sub>6</sub> G	68	0,817 ± 0,337	0,331 ± 0,233	0,575 ± 0,091
(CTC) <sub>6</sub> C	68	0,795 ± 0,085*	0,586 ± 0,102*	0,475 ± 0,175*
(CTC) <sub>6</sub> A	63	0,240 ± 0,135**	0,498 ± 0,042**	0,477 ± 0,100**
(CAC) <sub>7</sub> A	63	0,571 ± 0,161*	0,166 ± 0,088***	0,895 ± 0,018***
(CAC) <sub>7</sub> T	64	0,428 ± 0,142	0,346 ± 0,021	0,380 ± 0,078
GT(CAC) <sub>7</sub>	65	0,745 ± 0,072**	0,679 ± 0,107	0,540 ± 0,179**

\*P &lt; 0,05. \*\*P &lt; 0,01. \*\*\*P &lt; 0,001.

Таблица 4

Показатель доли полиморфных локусов (P) у животных из семей от коров, переживших катастрофу в этой же местности (I подгруппа семей), и у животных из семей от завезенных коров (II подгруппа семей)

Показатель	Подгруппа семей	
	I	II
F <sub>0</sub>	0,631 ± 0,191	0,424 ± 0,208
F <sub>1</sub>	0,679 ± 0,142	0,637 ± 0,181
F <sub>2</sub>	0,563 ± 0,138	0,461 ± 0,140
По всем животным одной подгруппы	0,655 ± 0,207	0,560 ± 0,086

держивался сходный уровень доли полиморфных локусов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сходстве по доле полиморфных локусов родительского поколения в обеих подгруппах и двух последующих поколений, несмотря на наличие у потомства одного и того же отца Урана.

В целом же, основываясь на анализе всех 162 выявленных локусов в родительском поколении F<sub>0</sub> и дочерних поколениях F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> исследуемой группы животных, не отмечено достоверного изменения показателя доли полиморфных локусов от поколения к поколению.

В сумме все эти факты свидетельствуют о том, что в группе животных, воспроизводящихся в условиях хронического действия низкодозового ионизирующего излучения, размах

генетической изменчивости, определяемый долей полиморфных локусов, несмотря на то, что все животные являются потомками одного быка, поддерживается в двух дочерних поколениях (F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>) на сходном уровне с родительским поколением (F<sub>0</sub>).

Анализ расчетной гетерозиготности (Hc) по поколениям позволил выявить изменение этого показателя с использованием 8 из 11 праймеров (табл. 5). Достоверным оказалось увеличение расчетной гетерозиготности в поколении F<sub>2</sub> относительно поколения F<sub>0</sub> для праймеров (AC)<sub>9</sub>G, (AGC)<sub>6</sub>G, (AGC)<sub>6</sub>C, (ACC)<sub>6</sub>C, а в поколении F<sub>2</sub> по отношению к F<sub>1</sub> — соответственно для праймеров (CT)<sub>9</sub>G, (CTC)<sub>6</sub>C, (CTC)<sub>6</sub>A и GT(CAC)<sub>7</sub> (табл. 5). Не отмечено достоверных изменений этого показателя по спектрам трех праймеров — (GA)<sub>9</sub>C, (CAC)<sub>7</sub>A и (CAC)<sub>7</sub>T.

При возвратном скрещивании коров поколения F<sub>1</sub> на отца (Урана) следовало бы ожидать возрастания инбридинга в поколении F<sub>2</sub>. Предположительно такое скрещивание должно приводить к возрастанию инбридинга и уменьшению гетерозиготности в поколении F<sub>2</sub> по сравнению с гетерозиготностью в родительских поколениях (F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>).

Однако анализ экспериментальных данных показал, что суммарно по спектрам всех 11 праймеров в группе исследованных животных выявлено достоверное увеличение расчетной гетерозиготности в дочернем поколении F<sub>2</sub> по

Таблица 5

Динамика изменения расчетной гетерозиготности ( $H_c$ ) между поколениями группы исследованных животных

Праймер	$H_c$		
	$F_0$	$F_1$	$F_2$
(AC) <sub>5</sub> G	0,174 ± 0,135 **	0,253 ± 0,045	0,428 ± 0,072 **
(GA) <sub>5</sub> C	0,333 ± 0,066	0,222 ± 0,095	0,310 ± 0,061
(CT) <sub>5</sub> G	0,287 ± 0,104	0,222 ± 0,156**	0,444 ± 0**
(AGC) <sub>6</sub> G	0,243 ± 0,170 *	0,310 ± 0,098	0,538 ± 0,109 *
(AGC) <sub>6</sub> C	0,215 ± 0,065 **	0,236 ± 0,047	0,457 ± 0,079 **
(ACC) <sub>6</sub> C	0,287 ± 0,053 *	0,202 ± 0,013	0,525 ± 0,105 *
(CTC) <sub>6</sub> C	0,224 ± 0,204	0,242 ± 0,092*	0,571 ± 0,228*
(CTC) <sub>6</sub> A	0,607 ± 0,186	0,370 ± 0,102*	0,571 ± 0,095 *
(CAC) <sub>7</sub> A	0,310 ± 0,196	0,387 ± 0,272	0,573 ± 0,128
(CAC) <sub>7</sub> T	0,228 ± 0,194	0,249 ± 0,053	0,356 ± 0,116
GT(CAC) <sub>7</sub>	0,291 ± 0,142	0,249 ± 0,082 ***	0,499 ± 0,096***

\*P < 0,05. \*\*P < 0,01. \*\*\*P < 0,001.

Таблица 6

Расчетная ( $H_c$ ) и ожидаемая ( $H_{ex}$ ) гетерозиготность с учетом коэффициента инбридинга по поколениям исследуемых животных

Показатель	$F_0$	$F_1$	$F_2$
Коэффициент инбридинга	0	0	0,250
Ожидаемая гетерозиготность с учетом коэффициента инбридинга ( $H_{ex}$ )	0,290 ± 0,069	0,290 ± 0,069	0,213 ± 0,060
Гетерозиготность расчетная ( $H_c$ )	0,290 ± 0,069***	0,267 ± 0,046***	0,441 ± 0,079***

сравнению с поколениями  $F_0$  и  $F_1$  ( $P < 0,001$ ) (табл. 6). В  $F_0$  в качестве ожидаемой гетерозиготности рассматривали суммарную расчетную по спектрам всех праймеров и предполагали, что она должна сохраниться в поколении  $F_1$ , поскольку в этом поколении коэффициент инбридинга равен 0 [16]. В  $F_2$  коэффициент инбридинга равен 0,250, и предполагаемая гетерозиготность должна была бы уменьшиться от  $F_1$  примерно на 25 %, однако этого не происходит, и в  $F_2$  расчетная гетерозиготность статистически достоверно ( $P < 0,001$ ) существенно увеличивается. Такое увеличение может свидетельствовать о вероятном приспособительном значении гетерозигот в популяционно-генетическом ответе на действие низкодозового ионизирующего излучения. Можно ожидать, что предпочтительное воспроизводство гетерозигот в  $F_2$  реализуется как на уровне предзиготической селекции гамет, так и в результате ранней эмбриональной смерти гомозигот.

Для удобства сравнения полилокусных спектров, выявляемых ISSR-PCR методом, были рассмотрены суммарно спектры продуктов амплификации в трех интервалах молекулярных масс (см. «Материалы и методы»). Анализ доли гетерозиготных особей в одном поколении ( $N_{g}/N$ ) по каждому локусу в этих трех интервалах с учетом всех использованных праймеров показал, что в родительском поколении  $F_0$  и дочернем поколении  $F_1$  достоверные различия между долей гетерозиготных особей, приходящихся на один локус в каждом из этих интервалов, отсутствуют. В дочернем поколении  $F_2$  отмечено достоверное увеличение ( $P < 0,001$ ) доли гетерозиготных особей на один локус, выявленный в интервале длин ампликонов до 1000 п.н. по сравнению с этим же показателем для интервала свыше 2000 п.н.

Следует также отметить, что особенностью генотипа самого Урана является то, что у него уровень гетерозиготности, судя по представ-

Таблица 7

Ожидаемая ( $f_{ex}$ ) и наблюдаемая ( $f_{ob}$ ) частота встречаемости доминантных аллелей, усредненная по всем выявленным ампликонам в каждой семье исследуемой группы животных

Семья (по имени коров-родоначальниц)	F <sub>1</sub>		F <sub>2</sub>	
	$f_{ex}$	$f_{ob}$	$f_{ex}$	$f_{ob}$
Альфа	0,490 ± 0,40	0,546 ± 0,041	0,421 ± 0,038	0,368 ± 0,037
Бета	0,541 ± 0,038	0,464 ± 0,037*	0,469 ± 0,037	0,417 ± 0,038
Гамма	0,490 ± 0,040	0,546 ± 0,041	0,560 ± 0,038	0,393 ± 0,037*
6803	0,474 ± 0,038	0,428 ± 0,038	0,452 ± 0,035	0,324 ± 0,035**
6824	0,519 ± 0,041	0,366 ± 0,040**	0,408 ± 0,040	0,382 ± 0,040
6827	0,494 ± 0,034	0,359 ± 0,031**		
6843	0,477 ± 0,039	0,353 ± 0,038*	0,400 ± 0,038	0,351 ± 0,037
4789	0,524 ± 0,041	0,509 ± 0,041		

\*P < 0,05. \*\*P < 0,01. \*\*\*P < 0,001.

Таблица 8

Схема распределения аллельных вариантов продуктов амплификации, фланкированных микросателлитными локусами и полученных с использованием праймера (AGC)<sub>6</sub>G, в поколениях семьи коровы Беты (А — доминантный аллель, О — рецессивный аллель)

Кличка, инвентарный №	Поколение	Размер амплификационных продуктов, п.н.																
		575	600	650	750	825	900	1000	1100	1400	1450	1500	1600	1700	1800	2000	2300	3200
Уран	F <sub>0</sub>	+AO	+AO	-OO	+AA	+AA	+AA	-OO	+AO	-OO	+AA	+AA	-OO	+AA	+AA	-OO	-OO	+AO
Бета	F <sub>0</sub>	-OO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AA	+AA	+AA	+AA	+AA	+AA	-OO
49	F <sub>1</sub>	-OO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AA	+AO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AO	+AO	-OO
113	F <sub>2</sub>	-OO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AA	+AO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AO	+AO	-OO
172	F <sub>2</sub>	-OO	-AO	+AO	+AA	+AA	+AA	+AO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AO	+AO	-OO
137	F <sub>2</sub>	+AO	+AO	-OO	+AA	+AA	+AA	+AO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AO	+AO	-OO
178	F <sub>2</sub>	-OO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AA	+AO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AO	+AO	-OO
175	F <sub>3</sub>	+OO	-OO	+AO	+AA	+AA	+AA	+AO	+AO	+AO	+AA	+AA	+AO	+AA	+AA	+AO	+AO	-OO

ленности типичных для него ампликонов у его потомства, превышал этот показатель, выявленный у всех коров-родоначальниц подвергшихся анализу семей. Усредненное значение этого показателя по всем исследованным локусам составило 0,605 у Урана против 0,263, например, у Беты. Вероятно, этим можно объяснить длительную активность и высокую плодовитость этого быка в условиях действия низкодозового ионизирующего излучения (более 15 лет).

Анализ полиморфизма и наследования 162 локусов не позволил выявить новых продуктов амплификации, появление которых можно было бы расценивать как мутационное событие. Однако в исследуемом потомстве отмечалось нарушение равновероятного распределе-

ния аллельных вариантов выявленных локусов по сравнению с родительским поколением. В частности не воспроизводился ни у одного из животных нисходящих поколений фрагмент, близкий по электрофоретической подвижности к размеру фрагмента ДНК маркера длиной 3140 п.н., присутствующий в спектре ампликонов Урана и полученный с использованием праймера (AGC)<sub>6</sub>G. Однако это событие может быть отнесено и к мутационным, связанным с генеративными клетками самого Урана.

Анализ ожидаемой ( $f_{ex}$ ) и наблюдаемой ( $f_{ob}$ ) частот встречаемости доминантных аллелей (см. «Материалы и методы») по поколениям в исследуемых семьях показал, что в большинстве семей (в 6 из 8) отмечались достоверные отличия между этими показателями (табл. 7),



причем в 4 семьях такие изменения отмечались уже в поколении  $F_1$ . Во всех выявленных случаях достоверных отличий ожидаемая частота ( $f_{ex}$ ) превышала наблюдаемую частоту ( $f_{ob}$ ) доминантного аллеля, что, по-видимому, отражает неравновероятную передачу ряда аллелей от родителей к потомству.

Как видно, например, из табл. 8, которая отображает распределение аллельных вариантов продуктов амплификации, фланкированных микросателлитными локусами в поколениях семьи, родоначальницей которой по женской линии является корова Бета, по ряду продуктов амплификации происходит преимущественное воспроизведение аллелей, характерных для материнского генотипа. Так, например, уникальные для быка Урана продукты амплификации длиной в 575 и 600 п.н. воспроизвелись только у двух потомков из шести исследованных в этой семье.

Сходные отклонения обнаруживались и в других семьях. Можно ожидать, что нарушения равновероятного наследования родительских аллелей в поколениях  $F_1$  и  $F_2$  обусловлены преимущественным воспроизводством гетерозигот в результате популяционно-генетической адаптации к действию новых факторов отбора.

**Выводы.** При анализе генетической изменчивости в поколениях исследуемой группы животных выявлено увеличение уровня расчетной гетерозиготности в поколении  $F_2$ . При этом размах генетической изменчивости, определяемый долей полиморфных локусов, поддерживался в трех поколениях на одном уровне как в целом по всей группе, так и в обеих подгруппах, которые берут начало от коров, переживших катастрофу в этой же местности, и от коров, завезенных в хозяйство позднее из относительно чистых районов Полесья. В поколениях  $F_1$  и  $F_2$  в 6 семьях отмечено нарушение равновероятного наследования родительских аллелей в сумме по всем использованным праймерам, что, вероятно, может являться следствием давления новых факторов отбора.

Таким образом в условиях хронического действия низкодозового излучения в группе исследуемых животных поддерживается уровень генетического полиморфизма, по-види-

мому, необходимый для расширения спектра их адаптивных возможностей. Не выявлено событий, которые можно было бы расценивать как мутационные, за исключением случая отсутствия у всех потомков амплификационного фрагмента длиной около 3200 п.н., выявленного в амплификационном спектре Урана.

**SAMMURY.** Polymorphism of DNA fragments flanked by microsatellite loci (ISSR-PCR) in cattle reproduced under low dose irradiation conditions. In this study the family analysis was performed of amplicon heredity (ISSR-PCR markers) in ancestral  $F_0$  generation and daughter's  $F_1$  and  $F_2$  generations of Holstein cattle reproduced in alienation zone of Chernobyl accident for investigation of genetic structure changes and polymorphism peculiarities under influence of low dose irradiation. Increasing of the heterozygosity calculated ( $Hc$ ) in  $F_2$  generation has been found that may be considered as response to ecological stress factor. No new amplicons have been revealed which could be evaluated as mutation events.

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено відтворення генетичної структури групи чорно-рябої голштинізованої худоби, що відтворюється в господарстві «Новошепеліч» в умовах хронічної дії низькодозового хронічного опромінення в 10-км зоні відчуження Чорнобильської АЕС у батьківській поколінні  $F_0$  та у двох дочірніх поколіннях  $F_1$  та  $F_2$ . Проведено аналіз поліморфізму та успадковування алельних варіантів фрагментів ДНК, фланкованих повторами микросателітних локусів (ISSR-PCR). Виявлено підвищення рівня розрахованої гетерозиготності у поколінні  $F_2$  та відсутність змін долі поліморфних локусів у досліджених дочірніх поколіннях по відношенню до відповідних показників у поколінні  $F_0$ . Не виявлено нових ампліфікаційних фрагментів, появу яких можна було б розцінювати як мутаційну подію.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dubrova Y.E., Jeffreys A.J., Malashenko A.M. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation // Nat. Genet. — 1993. — 5. — P. 92–94.
2. Dubrova Y.E., Jeffreys A.J., Malashenko A.M. Radiation-induced mutations in mouse minisatellite DNA // Genetika. — 1994. — 29. — P. 1157–1162.
3. Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J., Fennelly J., Goodhead D., Jeffreys A.J. Stage specificity, dose response and doubling dose for mouse minisatellite germ-line mutation induced by acute radiation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1998. — 95. — P. 6251–6255.
4. Dubrova Y.E., Nesterov V.N., Nikolay G.K., Vladislav A.O., Gilles V., Fabienne G., Je'rome B., Jeffreys A.J. Further evidence for elevated human minisatellite mutation rate

- in Belarus eight years after Chernobyl accident // *Mutat. Res.* – 1997. – **381**. – P. 267–278.
5. Kodaria M., Satho C., Hiyama K., Toyama K. Lack of effects of atomic bomb radiation on genetic instability of tandem-repetitive elements in human germ cells // *Amer. J. Hum. Genet.* – 1995. – **57**. – P. 1275–1283.
  6. Satoh C., Kadaria M. Effects of radiation on children // *Nature.* – 1996. – **383**. – P. 226.
  7. Weinberg H.S., Korol A.B., Kirzhner V.M., Avivi A., Fahima T., Nevo E., Shapiro S., Rennert G., Piatak O., Stepanova E.I., Skvarskaja E. Very high mutation rate in offspring of Chernobyl accident liquidators // *Proc. Roy. Soc. Lond.* – 2001. – **268**. – P. 1001–1005.
  8. Fernandez E., Figueiras M., Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – **104**. – P. 845–851.
  9. Reddy K.D., Nagaraju J., Abraham E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR // *Heredity.* – 1999. – **83**. – P. 681–687.
  10. Yasodha R., Kathirvel M., Sumathi R., Gurumurthi K., Archak S., Nagaraju J. Genetic analyses of casuarinas using ISSR and FISSR markers // *Genetic.* – 2004. – **122**. – P. 161–172.
  11. Sawyer N.A., Chambers S.M., Cairney J.W. Distribution of *Amanita* spp. genotypes under eastern Australian sclerophyll vegetation // *Mycol. Res.* – 2003. – **107**. – P. 1157–1162.
  12. Beckmann J.S., Weber J.L. Survey of human and rat microsatellites // *Genomics.* – 2000. – **12**. – P. 627–661.
  13. Rubinsztein D.C., Amos W., Leggo J., Goodburn S., Jain S., Li S.H., Margolis R.L., Ross C.A., Ferguson-Smith M.A. Microsatellite evolution: evidence for directionality and variation in rate between species // *Nat. Genet.* – 1995. – **10**. – P. 337–343.
  14. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* – 1994. – **20**. – P. 176–183.
  15. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М.: Наука, 1991.
  16. Иогансон И., Рендель Я., Граверт О. Генетика и разведение домашних животных. – М.: Колос, 1970.

Поступила 25.11.04