БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ.М.АКМУЛЛЫ

Труды Всероссийской конференции, посвященной 10-летию кафедры генетики БГПУ им. М. Акмуллы, приуроченной к ежегодным Вавиловским чтениям

«ИННОВАЦИОННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ»

Уфа 2009

УДК 575
ББК 28.04

Печатается по решению редакционно-издательского совета Башкирского государственного педагогического университета им. М.Акмуллы

Труды Всероссийской конференции, посвященной 10-летию кафедры генетики БГПУ им. М. Акмуллы, приуроченной к ежегодным Вавиловским чтениям «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем», Уфа, 23-27 ноября 2009. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2009. - 224 с.

В сборнике представлены результаты исследований по широкому кругу актуальных вопросов общей и медицинской генетики, нейрогенетики, популяционной генетики, биотехнологии и генетической инженерии.

Рассчитан на научных работников биологического профиля, аспирантов и студентов соответствующих специальностей.

Ответственный редактор: В.Ю.Горбунова

ISBN 978-5-87978-583-8

© Издательство БГПУ, 2009

УДК 575.224:599.323

С.Б. Ракитин,
Е.Б. Григоркина *к.б.н., доц.*,
Л.В.Ракитина
Институт экологии растений и животных
УрО РАН, г. Екатеринбург
О.В.Тарасов *к.б.н.*
ПО «Маяк», г.Озерск, Челябинская область

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК У КРАСНЫХ ПОЛЕВОК (*CLETHRIONOMYS RUTILUS*) ИЗ ЗОНЫ ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОГО РАДИОАКТИВНОГО СЛЕДА

Ключевые слова: микросателлитная ДНК, *Clethrionomys rutilus,* ВУРС

Краткая аннотация. Впервые исследовали показатели генетического разнообразия, оцененные по четырем микросателлитным локусам, у красных полевок, отловленных в зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа), на сопредельном участке и в референтной популяции. Наиболее четкие различия по анализируемым параметрам наблюдали между полевками из референтной выборки, испытывающими глобальное радиационное воздействие, и из зоны ВУРСа, в костной

ткани которых концентрация остеотропных радионуклидов была на два порядка величин выше, чем на фоновых участках.

Введение. Изучение эколого-генетических последствий загрязнения экосистем радионуклидами является одной из наиболее актуальных экологических проблем. Сообщества мышевидных грызунов, населяющих зону влияния ВУРСа, подвергаются действию ионизирующей радиации с 1957 года, когда произошла Кыштымская радиационная авария (Челябинская область, Южный Урал). Основным дозообразующим радионуклидом на радиоактивно загрязненной территории является ^{90}Sr, который накапливается в костной ткани позвоночных и представляет собой постоянный источник облучения жизненно важных органов и тканей организма. Логично предположить, что в популяциях грызунов, постоянно находящихся под воздействием сильного мутагенного фактора, можно ожидать как увеличения генетического разнообразия (за счет мутаций de novo), так и его снижения - в результате дифференциальной элиминации генотипов, неконкурентоспособных в экстремальных условиях среды. Необходимо отметить, что популяции грызунов (мышей и полевок) в зоне ВУРСа не являются изолированными [1], поскольку эта территория имеет специфическую конфигурацию – узкую и протяженную с быстро падающим градиентом радиоактивного загрязнения, а мыши и полевки характеризуются высокой вагильностью. Высокая миграционная активность приводит к тому, что в зоне ВУРСа формируется проточное население с постоянно меняющимся составом за счет мигрантов в обоих направлениях [2]. В этой связи ВУРС и сопредельные с ним территории могут служить уникальным полигоном для анализа результатов достаточно сильного и длительного (в течение более 100 поколений грызунов) мутагенного воздействия на индивидуальном и популяционном уровнях. Следует подчеркнуть, что грызуны, населяющие радиационный биоценоз, до сих пор не были охвачены исследованиями с использованием молекулярно-генетических методов. Генетические исследования в популяциях растений и животных в Восточно-Уральском радиационном заповеднике, в основном, проводились на хромосомном уровне в 60-80-х годах прошлого века [3-5]. В последнее время среди молекулярно-генетических методов, используемых в популяционно-экологических исследованиях, особое внимание уделяется анализу микросателлитной ДНК. Микросателлитная ДНК (микросателлиты) или STR-локусы (от англ. «short tandem repeats») – это особый класс ДНК-маркеров. Они представляют собой фрагменты ДНК с большим количеством – до сотни и более - тандемно повторяющихся идентичных «мотивов», обычно называемых «повторами»: короткими последовательностями из нескольких (как обычно принято считать – от 1 до 6) пар нуклеотидов. Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга длиной, в основном за счет разного числа содержащихся в них повторов. Микросателлиты в большом количестве распределены по всему геному эукариот и локализованы как в некодирующих, так и в кодирующих (значительно реже) участках генома [6]. Микросателлитные локусы высокополиморфны, например, у рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) из Центральной Финляндии в 66 исследованных локусах число аллелей варьировало от 6 до 38 на локус [7]. Такая высокая вариабельность микросателлитов объясняется их более высокими темпами мутирования по сравнению с мутабильностью остальной геномной ДНК [8-10]. Поэтому они зарекомендовали себя как эффективные маркеры для изучения генетических и демографических процессов в популяциях млекопитающих. В большинстве работ эти процессы исследуются в связи с пространственной организацией популяций и циклическими колебаниями численности грызунов [11-14]. В значительно меньшей степени изучена изменчивость микросателлитной ДНК млекопитающих и других позвоночных животных под влиянием техногенного загрязнения среды. Не всегда однозначные результаты в этом направлении были получены для радиоактивных поллютантов [15-17].

Цель настоящей работы – используя микросателлитные маркеры, сопоставить генетическое разнообразие в популяциях красной полевки (*Clethrionomys rutilus*) из зоны

ВУРСа, с сопредельной территории и в географически удаленной референтной популяции

Материал и методы. Объект исследования - красные полевки (*Clethrionomys rutilus*), отловленные в 2006 году в импактной зоне, расположенной вдоль центральной оси ВУРСа на расстоянии 13-20 км от взрыва, где первоначальная плотность загрязнения почвы ^{90}Sr составила 300-500 Ки/км^2. Сопредельный участок (п. Метлино, Каслинский район, Челябинская область) находится на расстоянии 12 км за границей радиационного заповедника и характеризуется фоновым уровнем загрязнения. В качестве референтной группы были использованы полевки из окрестностей с. Шигаево (Шалинский район, Свердловская область, 57° 20' с.ш. и 58° 40' в.д.), удаленного от первых двух мест отлова примерно на 220 км, для которого документировано лишь глобальное загрязнение [18]. Для исследования изменчивости микросателлитной ДНК было использовано 67 полевок. Анализировали изменчивость 4 микросателлитных локусов (MSCg4, MSCg9, MSCg15, LIST-3-003), состоящих из динуклеотидных повторов [19-20]. ДНК выделяли из мышечной ткани грызунов методом солевой экстракции. Амплификацию микросателлитной ДНК проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в работе Gockel et al. [19]. Размер аллелей определяли в денатурирующем полиакриламидном геле на автоматическом гелевом секвенаторе ALFexpress-II (Amersham Biosciences) при помощи программы Alfwin Fragment Analyser 1.03. Данные обрабатывали с использованием пакетов программ: Arlequin 3.11, Fstat 2.9.3.2, Micro-Checker 2.2.2., Genepop on the Web, GenAlEx 6 и Microsatellite Tools for Excel. Специальный анализ показал отсутствие ошибок детекции и нуль-аллелей. Все изученные локусы оказались высокополиморфными – от 6 до 13 аллелей на локус. Частоты генотипов по отдельным локусам не отклонялись значимо от равновесия Харди-Вайнберга (вероятности определяли с применением процедуры Бонферрони). Радиометрические исследования костной ткани выполнены по сертифицированной методике в ЦЗЛ ПО «Маяк».

Результаты и обсуждение. Содержание бета-активности в организме красных полевок из референтной территории не превышало 0, 5 Бк/г, также как и у грызунов с сопредельного зоне ВУРСа участка. Однако, среднее значение концентрации ^{90}Sr (±s.d.), депонированного в костной ткани грызунов из импактной выборки на два-три порядка величин превышало фоновые и соответствовало - 105, 5± 92, 1 Бк/г. Концентрация ^{90}Sr в анализируемых группах животных имела распределение, не отличающееся от нормального. В качестве показателя вариабельности распределения остеотропных радионуклидов использовано отношение максимального и минимального значений параметра. У красных полевок, отловленных в зоне ВУРСа, максимальное значение было 329 Бк/г, минимальное – 7,94 Бк/г. Следовательно, максимальная и минимальная концентрации различались в 41 раз. Столь выраженная степень различий в аккумуляции радионуклидов, связана как с мозаичностью и быстро падающим градиентом загрязнения, так и с высокой подвижностью красных полевок.

Показатели генетического разнообразия, усредненные по четырем микросателлитным локусам, в трех популяциях красной полевки представлены в таблице 1. Видно, что средняя наблюдаемая гетерозиготность была наибольшей у полевок из зоны ВУРСа, в остальных популяциях она была также высокой и близкой к значениям, наблюдающимся у других видов грызунов [12, 21-22]. Например, средняя наблюдаемая гетерозиготность у рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus)* из зоны влияния Среднеуральского медеплавильного завода (56°50' с.ш. и 59°51' в.д.) варьировала от 0,719 до 0,829 [22]. Для оценки возможного влияния остеотропных радионуклидов на темпы возникновения микросателлитных мутаций мы провели на индивидуальном уровне анализ связи между концентрацией ^{90}Sr в костной ткани полевок из зоны ВУРСа и гетерозиготностью по микросателлитным локусам. В результате была обнаружена тенденция к положительной связи между гетерозиготностью по микросателлитным локусам и концентрацией ^{90}Sr в костной ткани грызунов (Rs = 0,21; N=24; P=0,33). Устойчивость этой тенденции должна быть подтверждена (или опровергнута) в ходе дальнейших наблюдений за популяцией

красной полевки из зоны ВУРСа с увеличением количества исследованных локусов микросателлитной ДНК.

Таблица 1.

Усредненные по четырем микросателлитным локусам показатели генетического разнообразия в трех популяциях красной полевки

Показатель	Локалитет		
	ВУРС	Метлино	Шигаево
Число животных	24	15	28
H_E	0,867	0,849	0,845
H_O	0,906	0,867	0,857
F_{IS}	-0,046	-0.022	-0,015
Среднее число аллелей на локус	10	9,25	9,25
Число уникальных аллелей	1	3	1
Аллельное разнообразие	9,07	9,25	8,46
Индекс Гарза–Вильямсона	0,51343	0,38762	0,46981

Примечание. H_E – средняя ожидаемая гетерозиготность, H_O – средняя наблюдаемая гетерозиготность; F_{IS} – показатель инбредности.

Вычисленный по всем локусам показатель инбредности Fis оказался статистически незначимым во всех изученных выборках. Индекс Гарза-Вильямсона (отношение числа аллелей к диапазону их размеров) был наибольшим у полевок из зоны ВУРСа. Значения этого индекса свидетельствуют о сохранении генетического разнообразия в изученных популяциях, несмотря на возможный эффект «бутылочного горлышка» [23]. Отметим, что в зоне ВУРСа красная полевка является малочисленным видом и регистрируется в отловах не каждый год, поэтому вышеупомянутый феномен может иметь место. В то же время число уникальных аллелей (т.е. присутствующих в единственном экземпляре лишь в одной из всех исследованных популяций) и показатель аллельного разнообразия (allelic richness), учитывающий размеры выборок, были наибольшими у животных с сопредельного участка, который находится за границей Восточно-Уральского заповедника. Прилегающие к ВУРСу территории сейчас представляют собой уникальный полигон для оценки роли повышенной частоты мутаций в процессах эволюции природных популяций. Их мутационный пул расширяется за счет генных потоков из Восточно-Уральского заповедника и, вероятно, другим источником его пополнения может служить генетическая нестабильность, унаследованная от мигрантов с облучаемой территории [24].

Межпопуляционная генетическая дифференциация была оценена на основе дисперсии частот аллелей микросателлитных локусов (*F*st). Оказалось, что генетическая структура импактной (ВУРС) и референтной (Шигаево) группировок значимо различается (таблица 2). В то же время различия между группировкой из зоны ВУРСа и из окрестностей п. Метлино оказались на границе 5-% уровня значимости. При этом фоновые выборки (Метлино и Шигаево) не обнаружили значимой межпопуляционной дифференциации, несмотря на значительное расстояние между ними (220 км).

Таблица 2.

Оценки генетической дифференциации популяций (Fst–статистика) красной полевки по четырем микросателлитным локусам (над диагональю приведены значения вероятности)

Локалитет	Выборки		
	ВУРС	Метлино	Шигаево
зона ВУРСа	–	0,052	0,010
п. Метлино	0,01189	–	0,073
с. Шигаево	0,01549	0,01147	–

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее заметные различия по показателям генетического разнообразия наблюдаются между животными из референтной популяции (Шигаево), испытывающими лишь глобальное техногенное воздействие, и полевками из района ВУРСа, в костной ткани которых аккумулированы остеотропные радионуклиды, способные индуцировать повышенную нестабильность микросателлитных локусов. Кроме того, обнаружена тенденция к повышению некоторых показателей генетического разнообразия у полевок на сопредельной с ВУРСом территории (Метлино), что, вероятно, связано с миграционной активностью грызунов.

Авторы искренне признательны за всестороннюю помощь и поддержку сотрудникам лаборатории молекулярной систематики ЗИН РАН.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты: № 08-04-00638 и №07-04-96091) и программы президиума РАН «Биологическое разнообразие».

ЛИТЕРАТУРА

1. Григоркина Е. Б., Оленев Г. В. Роль конфигурации загрязненной территории в формировании проточных популяций (на примере грызунов) // Радиоактивность радиоактивные элементы в среде обитания человека: Мат–лы II междунар. конф. Томск: Тандем–Арт, 2004. С. 160–162.

2. Grigorkina E.B., Olenev G.V. Radioadaptation of rodents in the zone of local radioactive contamination (Kyshtim Accident, RUSSIA): 50 years on. Radioprotection. 2009. V. 44, N 5, 129-134.

3. Дубинин Н.П., Шевченко В.А., Алексеенок А.Я. и др. О генетических процессах в популяциях, подвергающихся хроническому воздействию ионизирующей радиации // Успехи современной генетики. М.: Наука, 1972. Т. 4.С. 170-205.

4. Шевченко В.А., Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. М.: Наука, 1985. 279 с.

5. Шевченко В.А., Абрамов В.И., Печкуренков В.Л. Генетические исследования на Восточноуральском радиоактивном следе // Экологические последствия радиоактивного загрязнения на Южном Урале. М.: Наука, 1993. С. 258-302.

6. Li Y., Korol A.B., Fahima T. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review // Molecular Ecology. 2002. V. 11. № 12. P. 2453–2465.

7. Rikalainen K., Grapputo A., Knott E. et al. A large panel of novel microsatellite markers for the bank vole (*Myodes glareolus*) // Molecular Ecology Resources. 2008. V.8. P. 1164–1168.

8. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // Chromosoma. 2000. V. 109. P. 365–371. [Erratum in: Chromosoma. 2001. V. 109. P. 571].

9. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference // Trends in genetics. 2000. V. 16. № 12. P. 551-558.

10. Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы её изучения // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. С. 74-96.

11. Gerlach G., Musolf K. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles // Conservation biology. 2000. V. 14. № 4. P. 1066-1074.

12. Ehrich D., Jorde P.E., Krebs C.J. et al. Spatial structure of lemming populations (*Dicrostonyx*

groenlandicus) fluctuating in density // Molecular Ecology. 2001. V. 10. № 2. P. 481–495.
13. Berthier K. Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations // Molecular Ecology. 2006. V.15. № 9. P. 2665-2676.
14. Redeker S., Andersen L. W., Pertoldi C. et al. Genetic structure, habitat fragmentation and bottlenecks in Danish bank voles (*Clethrionomys glareolus*) // Mammalian Biology. 2006. V. 71. № 3. P. 144–158.
15. Ellegren H., Lindgren G., Primmer C.R. et al. Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl // Nature. 1997. V. 389. P. 393–396.
16. Slebos R.J.C., Little R.E., Umbach D.M. et al. Mini- and microsatellite mutations in children from Chernobyl accident cleanup workers // Mutation Research. 2004. V. 559. P. 143–151.
17. da Cruz A. D., e Silva D. M., da Silva C.C. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents 19 years after the Cesium-137 accident // Mutation Research. 2008. V. 652. P. 175–179.
18. Гилева Э.А., Ракитин С.Б., Чепраков М.И. Геномная нестабильность у рыжей полевки: популяционно–экологические аспекты // Экология. 2006. № 4. С. 301–307.
19. Gockel J., Harr B., Schlötterer C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) and *Clethrionomys glareolus* (Rodentia, Cricetidae) // Molecular Ecology. 1997. V. 6. № 6. P. 597–599.
20. Barker F.S., Helyar S.J., Kemp S.J. Highly polymorphic microsatellite loci in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) // Molecular Ecology Notes. 2005. V. 5. № 2. P. 311–313.
21. Berckmoes V., Scheirs J., Jordaens K. et al. Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations // Environmental Toxicology and Chemistry. 2005. V. 24. № 11. P. 2898–2907.
22. Gileva E. A., Rakitin S. B., Fokin M. V., Abramson N. I., Mukhacheva S. V. Microsatellite DNA variation in Ural bank vole populations // Russian Journal of Ecology. 2008. V. 39. №. 7. P. 544–547.
23. Garza J.C., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // Molecular Ecology. 2001. V. 10. № 2. P. 305–318.
24. Гилева Э.А., Любашевский М.Н., Стариченко В.И. и др. Наследуемая хромосомная нестабильность у обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) из района Кыштымской ядерной аварии - факт или гипотеза? // Генетика. 1996. Т. 32, № 1.С. 114–119.

rakitin@ipae.uran.ru

Научное издание

Сборник Трудов Всероссийской конфеенции, посвященной 10-летию кафедры генетики БГПУ им. М. Акмуллы, приуроченной к ежегодным Вавиловским чтениям «Инновационные и молекулярно-генетические исследования живых систем», Уфа, 23-27 ноября 2009 г.

Публикуется в авторской редакции

Лиц. на издат. деят. Б848421 от 03.11.2000 г. Подписано в печать 23.11 2009.
Формат 60Х84/16. Компьютерный набор. Гарнитура Times New Roman.
Отпечатано на ризографе. Усл. печ. л. – 28,2. Уч.-изд. л. – 28,0.
Тираж 100 экз. Заказ №

ИПК БГПУ 450000, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а