

УДК 575.224:599.323

АНАЛИЗ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК У ГРЫЗУНОВ ИЗ ЗОНЫ ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОГО РАДИОАКТИВНОГО СЛЕДА И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

© 2016 г. С. Б. Ракитин, Е. Б. Григоркина, Г. В. Оленев

Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург 620144

e-mail: rakitin@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 17.06.2015 г.

Впервые проанализирована изменчивость четырех микросателлитных локусов у грызунов, отловленных в головной части Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа), с сопредельной фоновой и удаленной референтной территорий. Выявлены различия по параметрам генетического разнообразия между красными полевками из зоны ВУРСа и из референтной популяции. Обнаружено возрастание некоторых показателей генетического разнообразия у животных на сопредельном участке, что, вероятнее всего, связано с миграциями животных и конфигурацией зоны загрязнения. Следствием миграций является перенос радиационно-индуцированных эффектов на сопредельные территории и снижение возможности закрепления адаптивных приспособлений в чреде поколений у видов грызунов с высокой миграционной активностью в зоне локального радиоактивного загрязнения. Результаты работы позволяют рекомендовать микросателлитные маркеры для анализа радиационно-индуцированных эффектов у грызунов как модельных объектов радиоэкологического мониторинга.

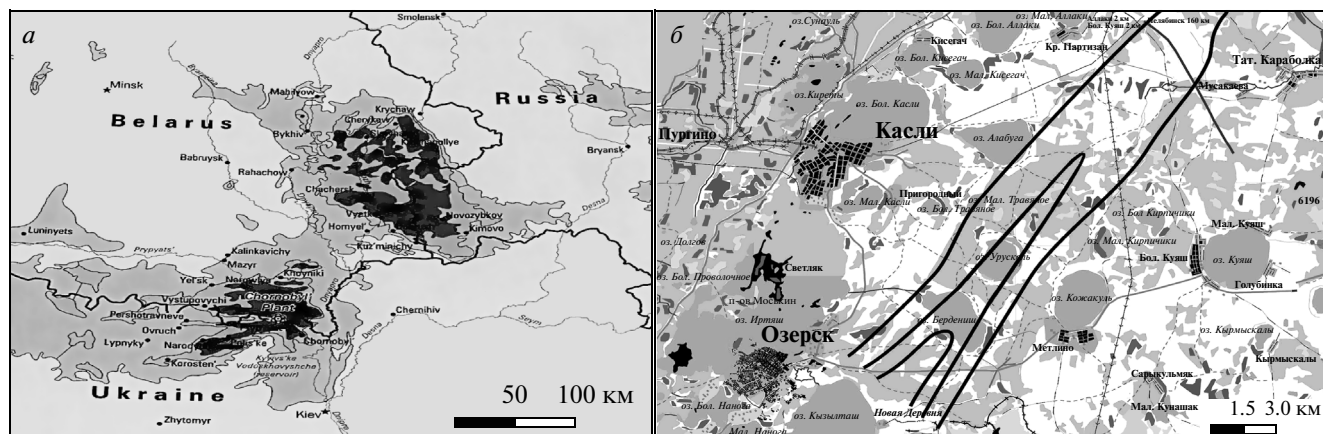
Ключевые слова: микросателлитная ДНК, Восточно-Уральский радиоактивный след (ВУРС), грызуны, миграции.

DOI: 10.7868/S0016675816030127

Восточно-Уральский радиоактивный след (ВУРС) — результат Кыштымской радиационной аварии на ПО “Маяк” 1957 г. (Челябинская обл. Южный Урал), является уникальной природной лабораторией для исследования аккумуляции радионуклидов и отдаленных эколого-генетических последствий хронического радиационного воздействия в популяциях растений и животных. Зона ВУРСа специфична не только по спектру, количеству радионуклидов, структуре экосистем, но и по конфигурации и размерам (рисунок). Это узкая протяженная территория с резко падающим градиентом радиоактивного загрязнения, что является одной из главных ее особенностей и проблемой № 1 при проведении эколого-генетических исследований на мелких грызунах. Из-за малого поперечного размера облака радиоактивные выпадения сконцентрировались вдоль оси его движения, где удельная плотность поверхностного загрязнения оказалась максимальной за счет малого рассеяния радиоактивных веществ атмосферой на большое расстояние [1]. Поэтому в районе проводимых исследований ширина полигона с плотностью загрязнения ^{90}Sr , равной 1000 Ки/км^2 , составляет 800 м , 500 Ки/км^2 — 1400 м , 250 Ки/км^2 — 1580 м , 50 Ки/км^2 — 1800 м . В этом плане, без преувеличения, зону ВУРСа можно считать уникаль-

ным планетарным образованием и столь же уникальным научным полигоном.

Микросателлитная ДНК (микросателлиты), или STR-локусы (от англ. “short tandem repeats”), представляет 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 [2–4]. Подавляющая доля мутаций в микросателлитных локусах возникает за счет специфической ошибки репликации ДНК в районе микросателлита — проскальзывания (англ. “slippage”) ДНК-полимеразы вдоль гомополимерной последовательности на число нуклеотидов, кратное длине повтора [5]. Кроме того, помимо изменений количества повторов, происходящих в результате проскальзывания цепей во время репликации, внутри микросателлитов также возможны точковые мутации и делеции/инсерции (не крат-



Размеры и конфигурация зон радиоактивного загрязнения. *a* – Чернобыльская зона, *б* – Восточно-Уральский радиоактивный след: области, выделенные изолиниями, – центральная (эпицентр ВУРСа), 500 Ки/км²; средняя – 100 Ки/км²; периферия – 20 Ки/км².

ные количеству нуклеотидов в повторе) [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 мутабельностью остальной геномной ДНК [3, 8, 9]. 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 [10–12]. В значительно меньшей степени изучена изменчивость микросателлитной ДНК млекопитающих и других позвоночных животных под влиянием техногенного загрязнения среды. В этих случаях происходит как непосредственное влияние токсикантов или физических факторов (например, ионизирующее излучение) на структуру ДНК, так и опосредованное через нарушение правильной репликации, своевременной репарации и, наконец, могут протекать направленные молекулярные процессы более высокого уровня, которые могут иметь адаптивное значение или быть следствием ослабления защитных свойств клетки [13]. Неоднозначность данных, полученных при изучении изменчивости микросателлитной ДНК у разных видов позвоночных животных под влиянием техногенного воздействия, свидетельствует о сложности проблемы. Так, имеются результаты исследований, согласно которым загрязнение местообитаний тяжелыми металлами (хром, никель мышьяк, кадмий, свинец) не всегда оказывает значимое

влияние на показатели генетического разнообразия рыжих полевок (*Cl. glareolus*) [14, 15], оцениваемое по микросателлитным маркерам, однако в случае лесной мыши такая связь вполне вероятна [16]. Неоднозначные результаты в такого рода исследованиях получены и для радиоактивных поллютантов [17–20].

Настоящая работа посвящена изучению генетического разнообразия по микросателлитным маркерам у красной полевки (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779) в зоне влияния ВУРСа и роли миграций грызунов в его изменчивости на сопредельных территориях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика объекта исследований и участков отлова грызунов. Объект исследования – красные полévки, отловленные в 2006 г. Красная полевка – широко распространенный вид в Уральском регионе. В зоне ВУРСа является одним из фоновых видов таксоцены грызунов, однако численность животных этого вида в фаунистических сборах была всегда низкой. Отметим, что “великая” засуха 2010 г. [21] привела к трансформации родентоценоза в сторону его упрощения (снижение видового разнообразия) – из грызунов остался единственный вид – малая лесная мышь (*Sylviaemus uralensis* Pall., 1811) [22]. Остальные виды (до 2010 г. регистрировалось 10 видов), в том числе и красная полевка, с тех пор в зоне радиоактивного загрязнения практически не встречаются. Грызунов отлавливали живоловками на трех участках (импактный, сопредельный фоновый и референтный). Импактный участок (Бердениш) находится в головной части зоны ВУРСа в окрестностях озера Бердениш (55°46' с.ш., 60°53' в.д.) в

13 км от эпицентра аварии, исходная плотность загрязнения почвы ^{90}Sr – 500 Ки/км² (6740–16690 кБк/м²). Гамма-фон на уровне почвы варьирует от 22 до 76 мкР/ч (в среднем – 50 мкР/ч), уровень бета-загрязнения – 90–942 частиц/мин × см² (в среднем – 380 частиц/мин × см²). Сопредельный фоновый участок – Метлино (55°48′ с.ш., 61°00′ в.д.) расположен за пределами радиационного заповедника в 9–10 км от импактного в окрестностях оз. Кожаккуль: гамма-фон – 12 мкР/ч, уровень бета-загрязнения – 12 частиц/мин × см², плотность загрязнения почвы ^{90}Sr – 2 Ки/км² (44 кБк/м²). Географически удаленным контролем (референтная группа) служила выборка из окрестностей с. Шигаево (Свердловская область, 57°20′ с.ш. и 58°40′ в.д.), находящегося на расстоянии 220 км от двух других участков (уровень загрязнения в пределах региональной нормы [23]).

Анализ изменчивости микросателлитной ДНК. Анализировали изменчивость четырех микросателлитных локусов (*MSCg4*, *MSCg9*, *MSCg15*, *LIST-3-003*), состоящих из динуклеотидных повторов [24, 25]. Тотальную ДНК выделяли из мышечной ткани методом солевой экстракции [26]. Амплификацию микросателлитной ДНК проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в работе Gockel et al. [24], с некоторыми модификациями. Полимеразную цепную реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси при следующих режимах: 3 мин при 94°C, далее 35 циклов (94°C – 20 с, 58°C – 20 с, 72°C – 20 с) и конечная элонгация при 72°C – 3 мин. На одну реакцию использовали 30–60 нг тотальной ДНК, 0.1 ед. *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия), SE-буфер однократный (60 mM трис-НСl (рН 8.5) 1.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0.1% тритон X-100) (“СибЭнзим”, Россия), 0.1 mM каждого дезоксирибонуклеотида, 1.5 mM MgCl₂, по 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров. Размер аллелей определяли в денатурирующем полиакриламидном геле на автоматическом гелевом секвенаторе ALFexpress-II (Amersham Biosciences) при помощи программы AlfwIn Fragment Analyser 1.03. Данные обработаны с использованием пакетов программ: Arlequin 3.5, Fstat 2.9.3.2, Micro-Checker 2.2.3, Genepop on the Web, GenAlEx 6.5 и Microsatellite Tools for Excel. Для анализа изменчивости микросателлитной ДНК в работе использовано 67 красных полевок.

Оценка миграций грызунов. Миграции грызунов в зоне влияния ВУРСа изучены методом группового мечения мелких млекопитающих тетрациклином (2002–2005 гг., 973 животных), которое осуществляли в соответствии с рекомендациями [27]. Приманку с тетрациклином раскладывали на землю в однородном биотопе на расстоянии 3 м друг от друга на площадках размером 30 × 300 м, расположенных в разные годы в эпицентре зоны радиоактивного загрязнения или на периферии

следа (подробнее см. [28]). Грызунов отлавливали давилками конструкции “Геро” методом ловушко-линий в разные сроки на разном удалении от участка мечения. Наличие метки определяли по желтому свечению в ультрафиолетовом свете в верхних резцах [27]. Грызуны разной экологической специализации, один раз попробовав приманку с тетрациклином, идентифицируются по желтому свечению в зубах в ультрафиолетовом свете. Этот факт верифицирован нами [28] в собственных виварных экспериментах, проведенных непосредственно перед мечением животного населения в природе. ^{90}Sr , депонированный в костной ткани, – количественный маркер пребывания животного в зоне ВУРСа. Однако остается нерешенным вопрос относительно времени нахождения зверька в радиационном биоценозе, необходимого для регистрации радиометрируемого количества ^{90}Sr , поскольку полученное в природе с пищей количество радионуклида сопоставить с таковым в экспериментах не представляется возможным.

Радиометрические исследования. Определение удельной активности ^{90}Sr в скелете грызунов (бедренные кости) выполнено к.б.н. О.В. Тарасовым в ЦЗЛ ПО “Маяк”. Пробы готовили методом мокрого озоления. Методика подготовки проб изложена ранее [22]. Измерения удельной активности ^{90}Sr выполнены β-спектрометрическим методом на приборе БС-1 (Озерск, Россия), ошибка измерений составляла не более 8%. Удельную активность радионуклидов в костной ткани рассчитывали на 1 г воздушно-сухой массы вещества (Бк/г). Данные анализировали после проверки характера их распределения, использовали среднее, максимальное и минимальное значения. Обработка данных проведена с использованием ПСП EXEL 6.0 и STATISTICA 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Удельная активность стронция-90 в костной ткани грызунов

Основным загрязнителем в зоне ВУРСа является ^{90}Sr [1], который накапливается в костной ткани позвоночных животных и служит источником внутреннего облучения. Удельная бета-активность ^{90}Sr в организме красных полевок из референтной территории не превышала 0.5 Бк/г, так же как и у грызунов с сопредельного зоне ВУРСа участка, что соответствует фоновому уровню содержания радионуклида у мелких млекопитающих на чистых территориях. Среднее значение удельной активности ^{90}Sr , депонированного в костной ткани грызунов на импактном участке, составляло 105.5 ± 92.1 Бк/г. Максимальная и минимальная величины различались в 41 раз (329 и 7.94 Бк/г соответственно). Столь выраженная степень различий в аккумуляции радионуклидов

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия в трех выборках красной полевки, усредненные по четырем микросателлитным локусам

Показатель	Локалитет		
	ВУРС (Бердениш)	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} – индекс фиксации Райта.

у красных полевок в значительной степени обусловлена конфигурацией зоны ВУРСа (рисунок), неравномерностью загрязнения территории и миграциями грызунов.

Изменчивость микросателлитной ДНК

Все изученные нами локусы оказались высокополиморфными, что типично для грызунов [4] – от 8 аллелей в *MSCg9* до 14 – в *MSCg4*. Размеры аллелей варьировали от 104 до 134 пн в локусе *MSCg4*, от 145 до 167 – в случае *MSCg9*, от 113 до 133 – в *MSCg15* и от 212 до 236 – в *LIST-3-003*. Частоты генотипов по отдельным локусам значимо не отклонялись от равновесия Харди–Вайнберга (вероятности определяли с применением процедуры Бонферрони). Специальный анализ показал отсутствие ошибок детекции и нуль-аллелей.

Показатели генетического разнообразия, усредненные по четырем микросателлитным локусам, в трех выборках красной полевки представлены в табл. 1. Средняя наблюдаемая гетерозиготность была наибольшей у полевок из зоны ВУРСа. В остальных выборках она также была высокой и близкой к значениям, наблюдавшимся ранее у других видов грызунов [7, 15, 16]. Например, средняя наблюдаемая гетерозиготность у близкого вида – рыжей полевки из зоны влияния Среднеуральского медеплавильного завода (56°50' с.ш. и 59°51' в.д.) варьировала от 0.719 до 0.829 [14]. Средние значения наблюдаемой гетерозиготности во всех изученных популяциях были выше по сравнению со средними значениями ожидаемой гетерозиготности. Об этом также свидетельствует отрицательное значение индекса фиксации Райта – F_{IS} , указывающее на эксцесс гетерозигот. В референтной выборке он имеет самое близкое к 0 значение (1.5%), свидетельствующее о том, что данная популяция находится в состоянии наиболее близком к равновесному. В импактной популяции эксцесс гетерозигот в 3 раза больше (4.6%) по сравнению с референтной, а на сопредельной с

ВУРСом территории имеет промежуточное значение (2.2%).

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 популяциях, несмотря на возможный эффект “бутылочного горлышка” [29]. Напомним, что в зоне ВУРСа красная полевка немногочисленна и регистрируется в отловах не каждый год, поэтому вышеупомянутый феномен вполне может иметь место. В то же время число уникальных аллелей (т.е. присутствующих в единственном экземпляре лишь в одной из всех исследованных выборок) и показатель аллельного разнообразия (allelic richness), учитывающий размеры выборок, были наибольшими у животных из сопредельного участка (Метлино).

Межпопуляционная генетическая дифференциация была оценена на основе дисперсии частот аллелей микросателлитных локусов (AMOVA, F_{st}). Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) показал невысокие уровни межпопуляционной дифференциации: определяемая ею доля дисперсии составляла 1.34% ($P = 0.005$). Уровень попарной межвыборочной дифференциации в величинах F_{st} по всем микросателлитным локусам изменялся от 0.01147 до 0.01549 (табл. 2). Оказалось, что генетическая структура импактной (ВУРС) и референтной (Шигаево) группировок значимо различается. В то же время различия между группировкой из зоны ВУРСа и из окрестностей пос. Метлино оказались на границе 5%-ного уровня значимости. Фоновая и референтная выборки (Метлино и Шигаево) не обнаружили значимой межпопуляционной дифференциации, несмотря на значительное расстояние между ними (220 км).

Для оценки возможного влияния остеотропных радионуклидов на темпы возникновения микросателлитных мутаций на индивидуальном уровне был проведен анализ связи между удельной активностью ^{90}Sr в костной ткани полевок из

зоны ВУРСа и гетерозиготностью по микросателлитным локусам. Обнаружена тенденция к положительной связи между этими параметрами ($R_s = 0.21$, $N = 24$, $P = 0.33$). Известно, что в соматических тканях индивидуумов с отсутствием ярко выраженной патологии определен набор аллельных вариантов по подавляющему большинству микросателлитных локусов сохраняется на протяжении всей жизни. Поэтому мы регистрируем как спонтанную, так и радиационно-индуцированную нестабильность генома по микросателлитным локусам, передающуюся через половые клетки родителей в соматические ткани потомства. В связи с этим логично ожидать увеличения нестабильности генома, в том числе и по локусам микросателлитной ДНК, у резидентов, обитающих в течение нескольких поколений в условиях радиоактивного загрязнения и у их потомков, по сравнению с особями из референтных зон. Однако, по всей видимости, в наблюдаемую картину корреляционной связи между удельной активностью ^{90}Sr в костной ткани полевок и уровнем гетерозиготности по микросателлитным локусам существенный вклад вносит высокая миграционная активность грызунов как в зоне загрязнения, так и за ее пределами. Устойчивость этой взаимосвязи будет подтверждена (или опровергнута) в ходе дальнейших исследований.

Особого внимания заслуживает полиморфизм по четности/нечетности числа пар нуклеотидов в локусе *MSCg15*, обнаруженный во всех трех изученных выборках красной полевки. В спектре нарушений, регистрируемых в локусах микросателлитной ДНК потомства родителей как спонтанных, так и индуцированных воздействием радиации и химических мутагенов, довольно частыми являются делеции, инсерции и транслокации. Они регистрируются как изменение длины аллелей простых тандемных повторов в результате функционирования различных процессов с вовлечением ДНК половых клеток, несущих нелетальные повреждения. Предполагается, что микросателлиты могут содержать «горячие точки» или сайты, по которым реализуются рекомбинационные и конверсионные события [30]. Во всех изученных нами выборках преобладали аллели с четным числом пар нуклеотидов, а остальные аллельные варианты были представлены нечетным числом пар оснований, причем наибольшее их число наблюдалось в импактной группе (25%), а наименьшее – на сопредельном участке (13.3%). Вероятно, нечетные аллели в локусе *MSCg15* возникли в результате инсерции или делеции нечетного числа нуклеотидных пар. Это может быть связано как с радиационным воздействием на грызунов в зоне ВУРСа, так и с особенностями мутационного процесса по данному локусу, поскольку нечетные аллели в меньшем количестве были также обнаружены у полевок из референтной группы (21.4%).

Таблица 2. Оценки генетической дифференциации (F_{st} -статистика) выборок красной полевки по четырем микросателлитным локусам

Локалитет	Зона ВУРСа (Бердениш)	п. Метлино	с. Шигаево
Зона ВУРСа (Бердениш)	–	0.052	0.010
п. Метлино	0.01189	–	0.073
с. Шигаево	0.01549	0.01147	–

Примечание. Под диагональю приведены значения F_{st} -статистики, над диагональю – значения вероятности.

Миграции грызунов

Рисунок иллюстрирует типы конфигураций зон радиоактивного загрязнения, образовавшихся в результате аварии на Чернобыльской АЭС 1986 г. (обширная территория) и Кыштымской радиационной аварии 1957 г. (узкая протяженная территория) (см. масштабы).

На большом статистическом материале (973 животных), полученном в течение 4 лет массового мечения животного населения тетрациклиновой меткой, были изучены миграции грызунов в зоне влияния ВУРСа [28]. Результаты свидетельствуют о высокой миграционной подвижности грызунов, о наличии активных перемещений животных как в зоне загрязнения, так и за пределы радиационного заповедника, т.е. о проточном населении – населении с постоянно меняющимся составом. Доля мигрантов из зоны ВУРСа на фонный участок в разные годы и сезоны варьировала от 5 до 30% [28]. Среди мигрантов зарегистрированы грызуны разной экологической специализации. Меченых зверьков (лесных и полевых мышей, а также красных полевок) отлавливали на весьма значительном удалении (9 км) от площадок, где раскладывали приманку с тетрациклином, в том числе за пределами радиационного заповедника, что является убедительным доказательством отсутствия изоляции животного населения в зоне ВУРСа. По данным радиоактивного (^{90}Sr) самомечения грызунов в зоне ВУРСа, доля мигрантов в выборках разных лет и сезонов варьировала от 17 до 40% [28]. Многолетние полевые исследования населения мелких млекопитающих в зоне ВУРСа также свидетельствуют о наличии сезонных межбиотопических миграций малых лесных и полевых мышей [22].

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее заметные различия по показателям генетического разнообразия наблюдаются между красными полемками из референтной популяции (Шигаево), испытывающими лишь глобальное техногенное воздействие, и полемками из района ВУРСа, в костной ткани которых аккумулятирова-

ны остеотропные радионуклиды, способные индуцировать повышенную нестабильность микросателлитных локусов. Выборки из зоны ВУРСа (Бердениш) и сопредельного участка (Метлино) значительно ближе друг к другу, чем к животным из Шигаево. На участках ВУРС и Метлино исключена изоляция расстоянием, поскольку оно составляет всего 9–10 км. Логично предположить, что наблюдаемые эффекты прежде всего связаны с миграциями грызунов и особенностями конфигурации зоны загрязнения. Из данных мечения следует, что обе метки (качественная – тетрациклин и количественная – ^{90}Sr) дают сходные результаты по доле мигрантов и убедительно доказывают отсутствие изоляции животного населения в зоне локального радиоактивного загрязнения.

Следствием миграций животных является перенос радиационно-индуцированных эффектов на сопредельные территории, где можно ожидать увеличения генетического разнообразия, индуцированного мутациями *de novo*. Это демонстрируют результаты данного исследования, полученные на основе анализа микросателлитной ДНК, в которых обнаружено повышение показателя аллельного разнообразия и числа уникальных аллелей в выборке красных полевок с сопредельного участка по сравнению с этими параметрами у грызунов из зоны ВУРСа и географически удаленного контроля (табл. 1). Подобную картину – более выраженные различия по показателям генетического разнообразия – наблюдали при исследовании изменчивости микросателлитной ДНК у рыжих полевок из района Среднеуральского медеплавильного завода (Свердловская обл.), в печени которых увеличено содержание мутагенных поллютантов (мышьяк, кадмий, свинец, хром, никель), и животными из референтной популяции, расположенной на расстоянии 90 км [14]. При этом выявлено повышение некоторых показателей генетического разнообразия (число частных аллелей, среднее число аллелей на локус) в периферийной зоне (20–30 км от источника эмиссии), где степень мутагенного загрязнения ниже, чем в импактной. Вероятно, миграции грызунов и здесь сыграли свою определяющую роль.

О значимости миграционного фактора в формировании генетического разнообразия у населения кенгуровых крыс (*Dipodomis merriami*), обитающих на участках, подвергшихся радиоактивному загрязнению в Неваде (США), и сопредельных территориях, сообщается в работе [31]. Было показано отсутствие четкой географической приуроченности распределения гаплотипов контрольного региона мтДНК к радиоактивно загрязненным или референтным участкам, при этом топологию построенного филогенетического дерева оказалось возможным объяснить только с учетом миграций грызунов. В итоге, с позиции определяющего влияния дисперсий грызунов на результаты цитогенетических и молекулярно-ге-

нетических исследований, авторы пришли к логичному заключению, что миграционные процессы 1) маскируют генотоксические эффекты радиационного воздействия у резидентов на радиоактивно загрязненных участках [31]; 2) снижают частоту уникальных аллелей у резидентов, что является эффективным индикатором генетического обмена [32]. По всей видимости, полученные нами результаты являются следствием миграционных процессов, обуславливающих “размывание” статистических эффектов при парном сравнении выборок из зоны ВУРСа, сопредельной и фоновой территорий. В пользу этого факта также свидетельствуют результаты, документированные при изучении геномной нестабильности на хромосомном уровне в клетках костного мозга обыкновенных полевок (*Microtus arvalis*), отловленных на сопредельной с ВУРСом территории (участок Метлино) [33], у которых были обнаружены мутантные кариотипы и повышенный уровень aberrантных метафаз по сравнению с полевками из зоны ВУРСа. Данные о влиянии микросателлитной ДНК на формирование хроматина и экспрессию генов-мутаторов [4] позволяют ожидать, что изменчивость в микросателлитных локусах в определенной степени может модифицировать частоту хромосомных мутаций в соматических клетках грызунов и быть положительно скоррелированной с ней, являясь маркером общегеномного мутационного фона в организме.

Изложенные нами материалы подтверждают вывод [33], что территории, прилегающие к Восточно-Уральскому радиационному заповеднику, в настоящее время представляют собой уникальный полигон (зона влияния ВУРСа) для оценки роли повышенной частоты мутаций в процессах микроэволюции природных популяций. Их мутационный пул расширяется за счет генных потоков из Восточно-Уральского заповедника. Особь, побывавшая в зоне ВУРСа, уносит в себе последствия радиационного воздействия, в том числе и на значительно удаленные сопредельные территории. Не исключено, что другим источником его пополнения может служить генетическая нестабильность, унаследованная от мигрантов из зоны загрязнения. Вокруг зоны ВУРСа создается территория с населением, несущим в себе последствия контакта с загрязнителем – своеобразное продолжение зоны на уровне биологических эффектов. Миграции на узкой и протяженной территории ВУРСа существенно снижают возможность передачи и закрепления адаптивных приспособлений в чреде поколений у видов грызунов с высокой миграционной активностью [28]. Об этом свидетельствуют выявленные нами существенные изменения в гемопозитической и иммунной системах [34], а также более высокий уровень хромосомной нестабильности и повышенная частота встречаемости микроядер в клетках костного мозга [35] грызунов из зоны ВУРСа.

Изучение аллозимной изменчивости показало отсутствие различий по набору и частоте аллозимов у красных полевок из зоны ВУРСа и сопредельных территорий [36].

Напротив, мелкие млекопитающие, обитающие на гигантской площади Чернобыльского загрязнения (рисунок, а), несмотря на миграции, подвергаются действию ионизирующей радиации в чреде поколений. Этого времени достаточно не только для формирования разного рода биологических эффектов, но и для их закрепления в геноме [37]. В то же время на границах Чернобыльской зоны происходят процессы, аналогичные таковым в зоне ВУРСа. Собственно зона ВУРСа (рисунок, б) – другой тип конфигурации – узкая протяженная радиоактивно загрязненная территория, биологические эффекты выражены [28, 34, 35], но подвержены постоянному “размыванию” за счет изменения состава населения.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что выборки грызунов из головной части зоны ВУРСа и из удаленного контрольного участка различаются по показателям изменчивости локусов микросателлитной ДНК. При этом обнаружено повышение ряда параметров внутрипопуляционного генетического разнообразия на сопредельном зоне ВУРСа участке, где уровень радиоактивного загрязнения соответствует таковому на территориях, разрешенных для проживания населения и ведения хозяйственной деятельности. Это, на первый взгляд, противоречие, вероятнее всего, связанное с миграционной активностью грызунов и особенностями конфигурации зоны радиоактивного загрязнения, требует дальнейшего исследования с увеличением количества локусов микросателлитной ДНК и объема анализируемых выборок. В этой связи также особо следует подчеркнуть необходимость учета миграционного фактора в широком спектре исследований при изучении отдаленных последствий у мелких млекопитающих в зонах локального техногенного загрязнения. Результаты работы дают все основания рекомендовать микросателлитные маркеры для анализа радиационно-индуцированных эффектов у грызунов как модельных объектов радиоэкологического мониторинга.

Работа поддержана РФФИ (№ 14-04-00614) и Программами фундаментальных исследований УрО РАН (№ 15-4-2-21 и 15-3-4-49).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тетерин А.Ф.* Эколого-климатические особенности зоны Восточно-Уральского радиоактивного загрязнения. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 368 с.
2. *Toth G., Gaspari Z., Jurka J.* Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis // *Genome Res.* 2000. V. 10. № 7. P. 967–981.
3. *Bhargava A., Fuentes F. F.* Mutational dynamics of microsatellites // *Mol. Biotechnol.* 2010. V. 44. № 3. P. 250–266.
4. *Li Y., Korol A.B., Fahima T. et al.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. № 12. P. 2453–2465.
5. *Шаихаев Е. Г., Животовский Л. А.* Эволюция микросателлитных локусов лососевых рыб // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 8. С. 967–974.
6. *Zhu Y., Strassmann J.E., Queller D.C.* Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites // *Genet. Res.* 2000. V. 76. № 3. P. 227–236.
7. *Rikalainen K., Grapputo A., Knott E. et al.* A large panel of novel microsatellite markers for the bank vole (*Myodes glareolus*) // *Mol. Ecol. Res.* 2008. V. 8. P. 1164–1168.
8. *Schlötterer C.* Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // *Chromosoma.* 2000. V. 109. P. 365–371.
9. *Ellegren H.* Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference // *Trends Genetics.* 2000. V. 16. № 12. P. 551–558.
10. *Gerlach G., Musolf K.* Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles // *Conserv. Biol.* 2000. V. 14. № 4. P. 1066–1074.
11. *Berthier K.* Migration and recovery of the genetic diversity during the increasing density phase in cyclic vole populations // *Mol. Ecol.* 2006. V. 15. № 9. P. 2665–2676.
12. *Redeker S., Andersen L. W., Pertoldi C. et al.* Genetic structure, habitat fragmentation and bottlenecks in Danish bank voles (*Clethrionomys glareolus*) // *Mammal. Biol.* 2006. V. 71. № 3. P. 144–158.
13. *Цветков И.Л.* Анализ распределения микросателлитной ДНК и причин внутривидового полиморфизма моллюсков // *Вестн. МГОУ. Сер. Естеств. науки.* 2011. № 5. С. 24–26.
14. *Gileva E. A., Rakitin S. B., Fokin M. V. et al.* Microsatellite DNA variation in Ural bank vole populations // *Rus. J. Ecol.* 2008. V. 39. № 7. P. 544–547.
15. *Mikowska M., Gaura A., Sadowska E., Świergosz-Kowalewska R.* Genetic variation in bank vole populations in natural and metal-contaminated areas // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2014. V. 67. P. 535–546.
16. *Berckmoes V., Scheirs J., Jordaens K. et al.* Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations // *Environ. Toxicol. and Chem.* 2005. V. 24. № 11. P. 2898–2907.
17. *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.
18. *Slebos R.J.C., Little R.E., Umbach D.M. et al.* Mini- and microsatellite mutations in children from Chernobyl accident cleanup workers // *Mutat. Res.* 2004. V. 559. P. 143–151.
19. *da Cruz A. D., da Silva D. M., da Silva C.C.* Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents 19 years after the Cesium-137 accident // *Mutat. Res.* 2008. V. 652. P. 175–179.
20. *Mairs R. J., Hughes K., Fitzsimmons S. et al.* Microsatellite analysis for determination of the mutagenicity of extremely low-frequency electromagnetic fields and ionising radiation *in vitro* // *Mutat. Res. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2007. V. 626. № 1. P. 34–41.

21. Шмакин А.Б., Чернавская М.М., Попова В.В. “Великая” засуха 2010 г. на Восточно-Европейской равнине: исторические аналоги, циркуляционные механизмы // Изв. РАН. Серия географич. 2013. № 6. 59–75.
22. Григоркина Е.Б., Оленев Г.В., Тарасов О.В. Радиоэкологические исследования на мелких млекопитающих в зоне влияния Восточно-Уральского радиоактивного следа: некоторые итоги // Вопр. радиац. безопасности. Спецвыпуск. 2013. № 4. С. 14–24.
23. Gileva E.A., Rakitin S.B., Cheprakov M.I. Genomic instability in the bank vole: population-ecological aspects // Rus. J. Ecol. 2006. V. 37. № 4. P. 271–277.
24. Gockel J., Harr B., Schlötterer C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) and *Clethrionomys glareolus* (Rodentia, Cricetidae) // Mol. Ecol. 1997. V. 6. № 6. P. 597–599.
25. Barker F.S., Helyar S.J., Kemp S.J. Highly polymorphic microsatellite loci in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5. № 2. P. 311–313.
26. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
27. Клевезаль Г.А., Мина М.В. Методика группового мечения грызунов с помощью тетрациклина и возможности ее использования в экологических исследованиях // Зоол. журн. 1980. Т. 59. Вып. 6. С. 937–941.
28. Григоркина Е.Б., Оленев Г.В. Миграции грызунов в зоне влияния Восточно-Уральского радиоактивного следа (радиобиологический аспект) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. № 1. С. 76–83.
29. Garza J.C., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // Mol. Ecol. 2001. V. 10. № 2. P. 305–318.
30. Безлепкин В.Г., Газиев А.И. Индуцированная нестабильность генома половых клеток животных по митохондриальным и микросателлитным последовательностям // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 475–488.
31. Theodorakis C.W., Bickham J.W., Lamb T. et al. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodomys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada Test Site, USA // Environ. Toxicol. and Chem. 2001. V. 20. № 2. P. 317–326.
32. Slatkin M. Rare alleles as indicators of gene flow // Evolution. 1985. V. 39. P. 53–65.
33. 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.
34. Григоркина Е.Б., Пашина И.А. К проблеме радиоадаптации мелких млекопитающих (экологическая специализация вида, радиорезистентность, гемопоез, иммунитет) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47. № 3. С. 371–378.
35. Yalovskaya L.E., Grigorkina E.B., Tarasov O. V. Cytogenetic consequences of chronic irradiation in rodent populations inhabiting the Eastern Ural Radioactive Trace zone // Biophysics. 2011. V. 56. № 1. P. 140–144.
36. Модоров М.В. Дозовые нагрузки и аллозимная изменчивость в популяциях красной полевки (*Clethrionomys rutilus*) из зоны Восточно-Уральского радиоактивного следа // Генетика. 2014. Т. 30. № 2. С. 181–188.
37. Ryabokon N.I., Goncharova R.I. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout // Radiat. Environ. Biophys. 2006. V. 45. P. 167–177.

Analysis of Microsatellite DNA in Rodents from Eastern Urals Radioactive Trace Zone and Contiguous Territories

S. B. Rakitin, E. B. Grigorkina, and G. V. Olenev

*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
Yekaterinburg, 620144 Russia*

e-mail: rakitin@ipae.uran.ru, grigorkina@ipae.uran.ru, olenev@ipae.uran.ru

The variability of four microsatellite loci of rodents, caught from the head part of Eastern Urals Radioactive Trace (EURT), along with the rodents inhabiting contiguous zone with background radiation level and distant reference territory, was analyzed for the first time. Differences in the parameters of genetic diversity between northern red-backed voles from the EURT zone and from the reference population were detected. An increase in some indices of genetic diversity in animals from a contiguous to the EURT zone was found; this is probably associated with animal migration and configuration of the area of pollution. A transfer of radiation-induced effects to the contiguous territories and a decrease in the possibility of fixation of adaptations in a series of generations of mobile rodent species in the area of local radioactive pollution are consequences of migrations. The results of the study make it possible to recommend microsatellite markers for the analysis of radiation-induced effects in rodents as model objects of radioecological monitoring.

Keywords: microsatellite DNA, Eastern Urals Radioactive Trace (EURT), rodents, migrations.