

ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКИЙ РАДИОАКТИВНЫЙ СЛЕД – ИСТОЧНИК ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ГРЫЗУНОВ НА СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

© 2024 г. Е. Б. Григоркина¹, *, С. Б. Ракитин, Г. В. Оленев¹

¹Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

*e-mail: grigorkina@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 25.05.2023 г.

После доработки 01.08.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Впервые в зоне локального радиоактивного загрязнения (ВУРС) исследованы полиморфизм фрагмента гена цитохром *b* (*cytb*) митохондриальной ДНК и миграционная активность красных полевок (*Myodes rutilus* Pallas, 1779). Результаты свидетельствуют о высоком гаплотипическом разнообразии у животных из зоны ВУРС и с сопредельной территории (9–10 км) по сравнению с референтной выборкой (220 км). Нуклеотидное разнообразие и среднее число парных различий между гаплотипами оказались наибольшими в выборке с сопредельного участка, где уровень радиоактивного загрязнения соответствует фоновым величинам. Предположение об ассоциации параметров генетического разнообразия с миграциями грызунов из зоны ВУРС верифицировано в полевых экспериментах методом группового мечения животного населения родамином. Выявлены мигранты обоих полов разного функционального статуса на фоновых участках. Дальняя дистанция (9500 м) является максимальной из известных для красных полевок. Зона ВУРС является источником генетической изменчивости в популяциях грызунов на сопредельных территориях за счет переноса мигрантами радиационно-индуцированных эффектов. Митохондриальная ДНК может служить эффективным маркером радиационного воздействия. Целесообразно совместное использование экологических и молекулярных маркеров при проведении мониторинга на грызунах в зонах локального радионуклидного загрязнения.

Ключевые слова: ВУРС, цитохром *b* митохондриальной ДНК, грызуны, миграция, групповое мечение, родамин В

DOI: 10.31857/S0869803124010086, EDN: NNGSGO

Проблема биологической эффективности воздействия малых доз ионизирующих излучений остается одной из актуальных проблем радиобиологии и радиоэкологии. Восточно-Уральский радиоактивный след – ВУРС (Южный Урал, Челябинская обл.) сформировался в результате Кыштымской радиационной аварии 1957 г. Дополнительное загрязнение территории (¹³⁷Cs) произошло в 1967 г. в результате переноса ила и песка с берегов оз. Карачай, которое использовалось в качестве открытого хранилища радиоактивных отходов [1]. Основными поллютантами в зоне ВУРС являются β-излучатели ⁹⁰Sr (95%) и дочерний ⁹⁰Y. Имея длительный период полураспада (28.79 лет), ⁹⁰Sr накапливается в скелете позвоночных и является источником облучения организма, поэтому может рассматриваться как пожизненный маркер принадлежности животных к зоне загрязнения. Однако до настоящего времени неизвестно время пребывания особи

на импактной территории, необходимое для регистрации радиометрируемого количества ⁹⁰Sr в организме.

Зона ВУРС отличается большой протяженностью при узком поперечном сечении с резко падающим градиентом загрязнения. Специфика конфигурации благоприятствует свободному перемещению мелких млекопитающих в обоих направлениях. Углубленное исследование миграций путем группового мечения животного населения тетрациклином выявило активные перемещения зверьков фоновых видов не только по территории радиационного заповедника, но и далеко за его пределами [2]. Миграции животных в зоне ВУРС рассматривались нами в качестве экологической характеристики, напрямую ассоциированной с адаптацией популяций вагильных и оседлых видов [3]. В настоящем исследовании эта же исходная посылка легла в основу предположения о влиянии дальних миграций грызунов

на генетическое разнообразие в популяциях на сопредельных территориях.

В настоящее время для оценки миграций мы используем краситель родамин В, который обладает рядом существенных преимуществ. Избирательно накапливаясь в кератинсодержащих структурах (волосы, когти, вибриссы) [4], он долго сохраняется, передается детенышам с молоком матери, а также легко детектируется в полевых условиях [5]. Однократное поедание приманки с родамином позволяет идентифицировать животных на любом удалении от площадки мечения, а также отследить расселение молодых зверьков из природных популяций с молочной меткой.

При изучении кумулятивного радиационного воздействия на природные популяции животных очевидным преимуществом обладают молекулярно-генетические маркеры, способные предоставить ценную информацию, часто недостижимую при использовании других подходов [6–10]. При этом высокую эффективность демонстрируют разные методы оценки ДНК-полиморфизма, в частности, анализ изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) [8–10]. МтДНК и сами митохондрии рассматривают как чувствительные мишени для воздействия ионизирующей радиации и других повреждающих агентов из-за повышенного уровня индуцируемых повреждений и низкой эффективности систем репарации ДНК в митохондриях [11]. Однако об эффектах хронического, пролонгированного низкодозового радиационного воздействия на митохондриальный геном у мелких млекопитающих из зон радиоактивного загрязнения известно крайне мало [12, 13]. В зоне Кыштымской аварии подобных исследований не проводили вовсе, несмотря на длительную историю существования радиоактивного полигона.

Цели работы: 1) изучение уровня полиморфизма фрагмента (866 пн) гена цитохрома *b* (*cytb*) мтДНК в популяциях красных полевок (*Myodes rutilus* Pallas, 1779) из зоны ВУРС, сопредельной и географически удаленной от фоновых территорий; 2) оценка миграционной/нерезидентной активности *M. rutilus* по результатам метода группового мечения мелких млекопитающих родамином В.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объект исследования – красные полевки – массовый широко распространенный вид мелких грызунов, приспособленный к различным

климатическим условиям. Для проведения молекулярно-генетических исследований животные одного функционального статуса (неразмножающиеся сеголетки) были отловлены живоловками на трех участках: импактный (Бердениш), сопредельный фоновый (Метлино) и референтный (Шигаево) (рис. 1). Участок Бердениш находится в зоне ВУРС в окрестностях оз. Бердениш (55°46' с. ш., 60°53' в. д.) в 13 км от эпицентра аварии (рис. 1, а). По современным оценкам [14] запас ^{90}Sr в почве составляет 9.7 МБк/м² (5.5–15.0); ^{137}Cs – 315 МБк/м² (173.6–429.1); $^{239, 240}\text{Pu}$ – 29.1 МБк/м² (25.0–33.2). Сопредельный фоновый участок – Метлино (55°48' с.ш., 61°00' в.д.) расположен на расстоянии 9–10 км от импактного в окрестностях оз. Кожакуль (рис. 1, б), плотность загрязнения почвы ^{90}Sr – 44 кБк/м². Референтная группа животных (внешний контроль) доставлена из окрестностей с. Шигаево (Свердловская обл., 57°20' с.ш. и 58°40' в.д.), удаленного от двух других участков на расстояние 220 км, уровень загрязнения находится в пределах региональной нормы (рис. 1). Существенные различия в уровне радиоактивного загрязнения трех экспериментальных участков являются исходными предпосылками для проверки гипотезы о радиационной обусловленности наблюдаемых биологических эффектов.

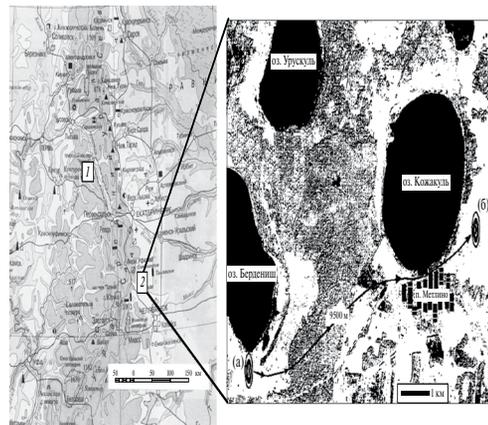


Рис. 1. Карта-схема расположения участков исследований: 1 – Шигаево (Свердловская обл.) – референтная территория; 2 – зона влияния ВУРС (Челябинская обл.). На врезке участки мечения и отлова мелких млекопитающих, дистанция 9300–9500 м (а – зона ВУРС, б – контроль).

Fig. 1. Study area map: 1 – Shigayev (Sverdlovsk oblast) – reference territory; 2 – Eastern-Urals radioactive trace zone (Chelyabinsk oblast). The highlighted fragment of the map shows of small mammals' marking and trapping plots, distance is 9300–9500 m (a – EURT zone, b – control).

Для проведения молекулярно-генетического анализа были получены образцы мышечной ткани от 30 особей. Тотальную ДНК выделяли из мышечной ткани, зафиксированной в 96%-ном этаноле, методом солевой экстракции [15] с некоторыми модификациями [16]. Фрагмент митохондриального гена *cytb* амплифицировали с использованием прямого UCSBU (5'ССА ТСА ААС АТС ТСА ТСС ТГА ТГА АА 3') и обратного LM (5'САА ТТА ТГС СГТ СТА ТТГ ГТА ТГ 3') праймеров [17] в 25 мкл реакционной смеси (состав смеси: 2 мкл ДНК (50–100 нг), 1 ммоль/л каждого праймера, 0.25 mM dNTPs, 2.5 ммоль/л MgCl₂, 10x ПЦР буфер (0.01 моль/л Tris Cl, 0.05M KCl, 0.1% Triton X–100; pH 9.0) и 0.2–0.3 ед/мкл Taq-полимеразы (Сибэнзим)). ПЦР проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler (BioRad) по следующей схеме: начальная денатурация 5 мин при 95 °С, затем 30 циклов: 30 с при 94 °С, 30 с при 55 °С, 1 мин при 72 °С и конечная элонгация 5 мин при 72 °С. Выделение и очистку ПЦР продуктов из агарозного геля осуществляли при помощи набора PureLink™ Quick (Invitrogen). Секвенирование проводили в обе стороны на автоматическом секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems) с использованием набора BigDye v.3.1. и тех же праймеров (UCSBU и LM) (что использовались для амплификации). Полученные нуклеотидные последовательности редактировались вручную в программе BioEdit 7.2.5 [18], с дальнейшим выравниванием в программе MEGA v.5.1. [19]. Межпопуляционную генетическую дифференциацию, оцениваемую на основании дисперсии частот гаплотипов мтДНК (AMOVA, Fst), и показатели генетической изменчивости (гаплотипическое (h) и нуклеотидное (p) разнообразие, среднее число парных различий между гаплотипами (k) и др.) рассчитывали с помощью программы Arlequin v. 3.5 [20].

Материалом для оценки нерезидентной активности грызунов в зоне влияния ВУРС послужили данные группового мечения животного населения родамином в период 2017 г. – апрель 2023 г. Мечение проводили ежегодно, в некоторые годы – дважды (в мае и в августе–сентябре) в сухую погоду. Дизайн и протокол экспериментов сходен, но в разные годы площадка мечения размером 1 га, на которой раскладывали приманку с RB (5 кг), располагалась либо на импактном участке (Бердениш) (рис. 1, а), либо на сопредельном фоновом – Метлино (рис. 1, б). Заметим, что участки отловов грызунов располагались в разных направлениях [2]. Однако

направление Бердениш – Метлино нас интересовало в максимальной степени для оценки перемещения зверьков на дальние дистанции и возможности преодоления ими ландшафтных препятствий. На пути следования, помимо дороги шириной 8 м с интенсивным двусторонним трафиком, предстояло пересечь окраину населенного пункта и поле сельскохозяйственного назначения.

Приготовление приманки и выявление метки по желтой флуоресценции выполнены согласно [5]. Контрольные отловы проведены в разные после мечения сроки на постоянных ловчих линиях как на площадках мечения (для оценки доли резидентов), так и на фоновом участке (для оценки доли дальних мигрантов). Выбор участков был основан на результатах предыдущего мечения тетрациклином [2], которые показали наиболее эффективные направления с учетом имеющихся в районе исследования ландшафтных препятствий – озер (рис. 1), локально увеличивающих плотность зверьков и шансы поимки меченых особей. Ловчая линия состояла из 40 крючковых давилок, установленных на расстоянии 10 м на 1 сут. Продолжительность отлова обусловлена особенностями размера и конфигурации загрязненной территории, единой схемой многолетних (2002–2023) исследований, а также сходным промысловым усилием [2]. Для каждого животного зафиксирована информация о видовой и половой принадлежности, морфофизиологических параметрах. Репродуктивный статус оценен по состоянию генеративных органов. Возраст полевок определен по регистрирующим структурам зуба согласно [21]. Число животных, отловленных в период 2017–апрель 2023 г., составило 36 особей.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, и принципам Базельской декларации. Проведение исследований разрешено Комитетом по биоэтике Института экологии растений и животных УрО РАН (г. Екатеринбург), протокол № 9 от 4 июня 2021 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полиморфизм фрагмента гена цитохрома b (cytb) мтДНК M. rutilus

Показатели генетического разнообразия *M. rutilus* с анализируемых участков, полученных на основании анализа полиморфизма фрагмента

(866 пн) гена *cytb* мтДНК животных, представлены в табл. 1.

Выявлено более высокое гаплотипическое разнообразие по фрагменту гена *cytb* у животных из зоны ВУРС по сравнению с референтной выборкой. Аналогичная картина по индексу гаплотипического разнообразия фрагмента гена *cytb* мтДНК отмечена между выборками с сопредельного участка (Метлино) и референтной территории. Обращает на себя внимание более высокое значение этого индекса у зверьков из Метлино. Нуклеотидное разнообразие и среднее число парных различий между гаплотипами оказались также наиболее высокими в выборке полевок из Метлино, где уровень радиоактивного загрязнения соответствует фоновым величинам. При сравнении выборок из зоны ВУРС и референтной (Шигаево) эти показатели оказались близкими по значениям. По предварительным оценкам обнаружен достаточно высокий уровень межпопуляционной генетической дифференциации ($F_{st} = 0.112$), рассчитанной на основе дисперсии частот гаплотипов мтДНК; определяемая ею доля дисперсии составила 11.20% ($P = 0.018$). В итоге, наиболее высокие значения всех трех индексов генетического разнообразия наблюдались на двух участках: в выборках из зоны ВУРС (Бердениш) и с сопредельной территории, удаленной на 9–10 км.

Миграционная/нерезидентная активность *M. rutilus*

В ходе проведения исследований с использованием методики мечения животного населения родамином было отловлено 36 красных полевок: 19 самцов и 17 самок. Восемь особей (22%) оказались с меткой (шесть самцов и две самки) (табл. 2). Согласно протоколу, системная метка

(фиксированная в ткани) хорошо видна в вибриссах, когтях, волосяном покрове вентральной поверхности тела [5].

Пять из 36 особей с меткой (14%) были добыты в разные сроки (43–210 дн.) на площадке мечения (контроль), т. е. они сохранили связь с территорией и могут рассматриваться как оседлые (табл. 2, № 1–4). Возраст животных по одонтологическим критериям подтверждает резидентность по крайней мере четырех зверьков: двух сеголеток и двух зимовавших.

Три из 36 меченых зверьков (8%) можно с уверенностью отнести к нерезидентам, причем два из них являются мигрантами на дальние дистанции. Среди них – самка-сеголетка (табл. 2, № 6) пометилась в конце мая 2019 г. на площадке в зоне ВУРС (рис. 1, а), отловлена в августе на контроле (рис. 1, б). Системная метка в вибриссах, когтях, в волосяном покрове разных участков тела иллюстрирует факт поступления приманки с кормом (рис. 2, а, б). В вибриссах обнаружена двойная метка, указывающая на поедание приманки дважды (рис. 2, а). Продолжительность сохранения биомаркера в вибриссах не превышает 2 мес. [22]. В нашем случае, она обнаружена спустя 78 дней после мечения. Возраст зверька (100 дней) указывает на дату и место рождения (середина апреля, зона ВУРС). В середине мая самка вышла из гнезда, прожила на площадке мечения в зоне радиоактивного загрязнения около месяца, получив биомаркер дважды. За этот период созрела, вступила в размножение и переселилась (breeding dispersal) [23] на контрольный участок. На момент отлова была беременной.

Второй интересный результат касается двух самцов-мигрантов, пойманных в 2022 г. Один из них – зимовавший половозрелый (табл. 2, № 7) пометился в зоне ВУРС (рис. 1, а) в сентябре

Таблица 1. Генетический полиморфизм фрагмента гена цитохрома *b* (866 пн) мтДНК красной полевки (*M. rutilus*) из зоны ВУРС, сопредельной фоновой (Метлино) и референтной (Шигаево) территорий

Table 1. Genetic polymorphism of gene cytochrome *b* (*cytb*) fragment of mitochondrial DNA (mtDNA) of *M. rutilus* from EURT zone, adjacent background (Metlino) and reference (Shigaevo) territories

Участки	Число образцов	Число гаплотипов	$h \pm SD$	$\pi (\times 100) \pm SD$	$k \pm SD$
Бердениш (ВУРС)	9	9	0.913 ± 0.111	0.398 ± 0.337	3.232 ± 2.122
Метлино (контроль)	13	9	0.936 ± 0.051	0.456 ± 0.274	3.949 ± 2.114
Шигаево (референтная территория)	8	5	0.786 ± 0.151	0.392 ± 0.255	3.393 ± 1.939

Примечание. h – гаплотипическое разнообразие; π – нуклеотидное разнообразие; k – среднее число парных различий между гаплотипами; SD – стандартное отклонение.

2021 г., оказался в улове из Метлино (контроль) (рис. 1, б) в мае 2022 г. (спустя 251 день). Системная метка обнаружена на шерсти головы, шеи, живота (рис. 2, в). Во время перемещения он преодолел ряд ландшафтных препятствий, отловлен в березовом лесу в прибрежной зоне оз. Кожакуль, через дорогу в 200 м от контрольного участка (рис. 1, б), где и попался.

Совокупное расстояние после посещения площадки мечения в зоне загрязнения составляет 9500 м. На самом деле, возможно, оно больше! Ясно, что приманку с красителем он ел осенью, на что указывают метки на разных участках шерсти и их отсутствие в когтях и вибриссах животного. Важно, что перемещение на столь внушительную дистанцию произошло в осенне-зимний

Таблица 2. Характеристика меченых красных полевков (*M. rutilus*), срок сохранения и локализация метки, дистанция перемещения мигрантов

Table 2. Characteristic of marking red-backed voles (*M. rutilus*), retention time and localization of label, dispersion distance

№	Дата отлова	Пол	Вес, г Возраст, дни	Функциональный статус, показатели генеративного состояния (масса семенника, мг, состояние матки)	Миграционный статус, дистанция, м	Локализация метки	Срок метки, дни
1	09.2019	♂	15.0, 100	Неполовозрелый сеголеток 6.0	Резидент	Когти, вибриссы, шерсть	53
2	08.2020	♀	23.0 200	Половозрелый сеголеток; 3 группы плацентарных пятен	Резидент	Когти, вибриссы, шерсть	43
3	07.2021	♂	19.0 40	Половозрелый сеголеток 116.0	Резидент	Нос, рот, когти задних лап, живот, хвост	43
4	12.04.2023	♂	19.0 290	Зимовавший 125.0	Резидент	Щеки, шея, вентральная сторона тела, лапы, хвост	210
5		♂	19.0 250	Зимовавший 102.0	Резидент	Щеки, шея, вентральная сторона тела, лапы, хвост, спина	210
6	08.2019	♀	34.0 100	Половозрелый сеголеток, подсосные пятна, 8 эмбрионов, масса 1 эмбриона 270.0	Дальний мигрант – ВУРС-К, 9300	Двойная метка в вибриссах, шерсть на морде, ушах, хвосте, вокруг лап, когти	78
7	05.2022	♂	25.0 360	Зимовавший 178.0	Дальний мигрант/транзиент ВУРС-К + 200, 9500	Голова, шея, два симметричных пятна на животе	251
8	09.2022	♂	14.0 55	Неполовозрелый сеголеток 8.0	Экскурсант, 200	Частицы красителя на морде, передних и задних лапах	14 час

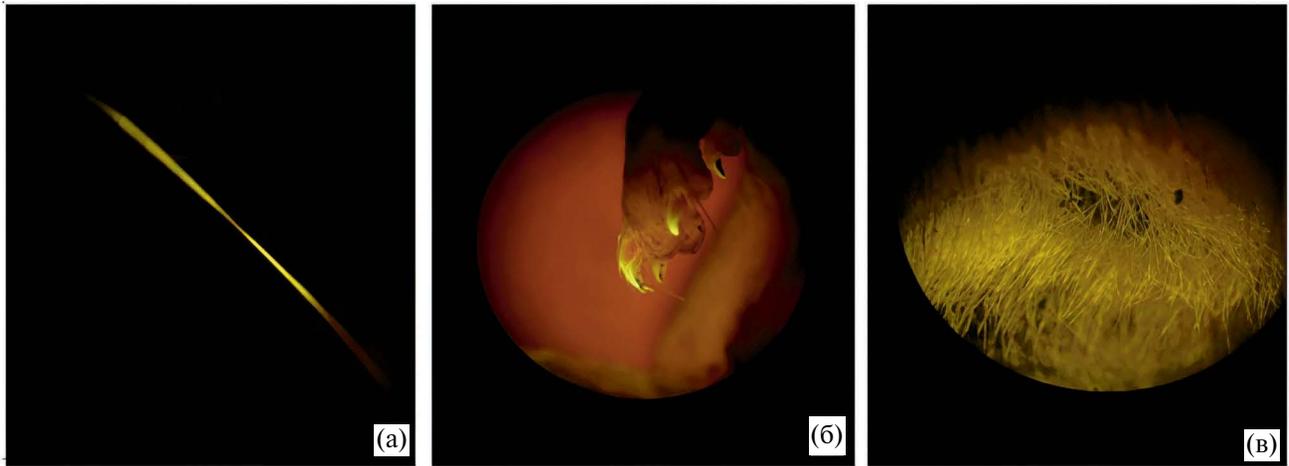


Рис. 2. Родаминовые метки (желтая флуоресценция) у дальних мигрантов красных полевок (*M. rutilus* Pallas, 1779) при поедании приманки с красителем: а – двойная метка в вибриссе и б – метка в когтях самки-сеголетки через 78 дней после раскладывания приманки с родамином В; в – метка на шее зимовавшего самца спустя 251 день после мечения.

Fig. 2. Rhodamine labels (yellow fluorescence) in long-distance migrants of red-backed voles (*M. rutilus* Pallas, 1779) at eating of bait with dye: а – double label in vibrissae and б – label in claws of underyearling female through 78 days after exposure to bait with marker; в – label on neck of the overwintering male through 251 days after marking.

период. Этого зверька следует рассматривать как дальнего мигранта, возможно, транзитного, прошедшего сквозь площадку мечения либо при расселении (natal dispersal) – перемещении особи от места рождения до места возможного размножения [24], либо при переселении (breeding dispersal) [23]. Обращает на себя внимание факт максимального значения сохранности достаточно яркой метки на разных участках тела зверька через 251 день после мечения. Это наибольшая длительность сохранения метки у лесных полевок из природной популяции, а также максимальная из известных дистанций для вида. Ранее описанные сроки сохранности метки у млекопитающих насчитывают 225 дней [25], у лабораторных мышей – 423 дня [5].

Второй неполовозрелый самец с меткой (табл. 2, № 8) (возраст – 55 дней) также попался в березовом лесу у оз. Кожакуль в сентябре 2022 г. через 14 ч после раскладывания приманки на контрольной стационарной площадке Метлино (рис. 1, б). Участок отлова находился у озера, через дорогу на расстоянии 200 м от площадки мечения. Несистемная метка (ярко флуоресцирующие частицы в местах контакта с красителем) – результат случайного соприкосновения с приманкой. Не исключено, что в данном случае мы имеем дело с краткосрочной экскурсией: либо с кочевым образом жизни, либо со сдвигом

участка. Указанные типы поведения (по [26]), тесно связаны с расселением и названы «псевдорасселением» (quasi-dispersal). Эта сборная группа характеризуется непредсказуемостью посещения той или иной точки пространства. Таких животных предложено объединять в категорию нерезидентов [27].

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что с момента образования радиоактивного следа прошло 67 лет (более двух периодов полураспада ^{90}Sr), до настоящего времени значительная часть зоны ВУРС сохраняет высокие концентрации радионуклида во всех компонентах среды. Мощность дозы на красный костный мозг мышеобразных, населяющих импактную территорию, достигает 300 мкГр/ч [28]. Эти значения выше дозового порога в 100 мкГр/ч, установленного НКДАР ООН [29], что может приводить к радиационно-индуцированным биологическим эффектам. У грызунов из зоны ВУРС зарегистрированы изменения в гемопозитической и иммунной системах [30], выявлен повышенный уровень хромосомной нестабильности в клетках костного мозга [31].

Результаты настоящего исследования показывают, что выборки грызунов из зоны ВУРС и из географически удаленного (200 км) референтного участка различаются по уровню

гаплотипического и нуклеотидного разнообразия фрагмента гена *сyt b* мтДНК. Из этого следует, что актуальные дозовые нагрузки, получаемые мелкими млекопитающими в головной части зоны ВУРС, могут быть причиной полиморфизма мтДНК у животных, обитающих на импактной территории. Показана высокая чувствительность мтДНК к действию эндогенных активных форм кислорода и экзогенных повреждающих агентов по сравнению с ядерной ДНК (ядДНК) [11]. По мнению авторов, уязвимость мтДНК взаимосвязана с рядом особенностей. Во-первых, со спецификой ее укладки в митохондрии и агрессивным окислительным микроокружением. Во-вторых, более низкой скоростью и меньшей эффективностью функционирования механизмов репарации ДНК в митохондриях, обусловленной недостаточным поступлением белков в митохондрии. Поэтому значительное количество повреждений мтДНК реализуется в мутации и делеции. Установлено, что при облучении клеток ионизирующей радиацией частота возникновения щелочно-лабильных сайтов и одно-двунитевых разрывов в мтДНК в 2 раза больше, чем в яДНК [32]. При γ -облучении крыс в дозе 3 Гр, наряду с возникновением митохондриальной дисфункции в печени животных, отмечено снижение количества мтДНК на 50% в отличие от яДНК из расчета на единицу веса сырой ткани [33].

В литературе ощущается дефицит информации об эффектах хронического, пролонгированного радиационного воздействия на митохондриальный геном животных. Имеются данные, указывающие на значимость миграционного фактора в формировании генетического разнообразия, оцениваемого по молекулярным маркерам, в популяционных группировках кенгуровых крыс (*Dipodomis merriami*), населяющих радиоактивно загрязненные и сопредельные участки в Неваде (США) [12]. Обнаружено отсутствие четкой географической приуроченности распределения гаплотипов контрольного региона мтДНК к радиоактивно загрязненным и референтным участкам. Вместе с тем топологию филогенетического дерева и направление перемещений крыс оказалось возможным объяснить исключительно на основе миграционных процессов. Дифференцированный анализ особей по мтДНК позволил рассчитать долю мигрантов в разных направлениях, где наибольший процент (57%) пришелся на перемещения с контрольных участков на «грязные». Сделан вывод, что дисперсии

маскируют генотоксические эффекты радиационного воздействия у резидентов на радиоактивно загрязненных участках, а также снижают у них частоту уникальных аллелей, что является эффективным индикатором генетического обмена [12].

В другом исследовании впервые продемонстрировано увеличение митохондриального разнообразия у рыжих полевок (*Myodes glareolus*) с радиоактивно загрязненных участков в зоне Чернобыльской аварии в сравнении с животными, доставленными с референтных территорий [13]. Пробы, полученные от полевок с «грязных» участков, показали значительно более высокое число гаплотипов и полиморфных локусов, а также более высокое среднее число замен на локус, использованных для оценки генетического разнообразия. Авторы объясняют полученные данные возрастанием скорости мутационного процесса при непрерывном низкодозовом радиационном воздействии в течение 25 лет после аварии на Чернобыльской АЭС, за которые у грызунов сменилось 50 поколений.

В зоне Кыштымской аварии с 1957 г. у мышевидных грызунов сменилось более 130 поколений, но наши результаты демонстрируют интенсивность мутационного процесса у животных, что важно для понимания и оценки последствий низкодозового радиационного воздействия. Наибольшие значения индексов генетического разнообразия наблюдались на участках, взаимосвязанных миграционными отношениями (Бердениш и Метлино). Особый интерес представляет повышенный уровень нуклеотидного разнообразия и среднего числа парных различий между гаплотипами на прилежащем к зоне ВУРС участке (Метлино), где уровень радиоактивного загрязнения соответствует фоновым величинам.

Ранее впервые на основе совместного использования экологических (миграции) и генетических маркеров (изменчивость микросателлитных локусов) у *M. rutilus*, отловленных на этих же экспериментальных участках, нами были обнаружены существенные различия по параметрам генетического разнообразия у особей из зоны ВУРС и референтной выборки (Шигаево) [34]. Среднее значение удельной активности ^{90}Sr , депонированного в костной ткани грызунов зоны ВУРС, составляло 105.5 ± 92.1 Бк/г. Максимальная и минимальная величины различались в 41 раз (329 Бк/г и 7.94 Бк/г). Удельная активность ^{90}Sr в организме полевок из Шигаево и Метлино не превышала 0.5 Бк/г, что соответствует фоновому уровню содержания радионуклида у мелких

млекопитающих на чистых территориях. Было выявлено возрастание некоторых показателей генетического разнообразия (число уникальных аллелей и индекс аллельного разнообразия (allelic richness)), учитывающего размеры выборок у животных на сопредельной территории (Метлино). Логично предположить, что наблюдаемая картина по показателям генетического разнообразия, оцениваемого по обоим молекулярным маркерам (изменчивости микросателлитной и мтДНК), может быть ассоциирована с локальностью зоны загрязнения и миграциями животных, которые приводят к отсутствию пространственной изоляции населения между анализируемыми участками. При этом существенные различия в уровне радиоактивного загрязнения ключевых участков подтверждают нашу гипотезу о радиационной обусловленности наблюдаемых биологических эффектов.

С радиобиологической точки зрения интерес представляют миграции грызунов из зоны ВУРС на прилегающие территории. Результаты мечения родамином выявили миграции полевок разного функционального статуса на сопредельный фоновый участок. В совокупности с ранее опубликованными данными по мечению тетрациклином [2] новые материалы по мечению родамином пополняют информацию о миграционной/нерезидентной активности грызунов как в зоне загрязнения, так и за ее пределами в разные сезоны года. Отсюда следует, что в зоне ВУРС проживает население грызунов с меняющимся составом за счет иммигрантов с сопредельных территорий и эмигрантов из зоны загрязнения, что имеет принципиальное значение. Следствием миграционных событий является поток генов между популяциями и перенос радиационно-индуцированных эффектов на сопредельные территории, что приводит к увеличению параметров генетического разнообразия. Представленные результаты удовлетворительно соотносятся с данными, полученными ранее при изучении хромосомной нестабильности в клетках костного мозга обыкновенных полевок (*Microtus arvalis*) из зоны ВУРС, а также лесных (*Sylvaemus uralensis*) и полевых (*Apodemus agrarius*) мышей, отловленных за пределами радиационного заповедника [31, 35]. Заметим, что подход, предполагающий совместное использование экологических и генетических маркеров, впоследствии был рекомендован [10] для анализа популяционной структуры вида, связанного с изучением факторов адаптации популяций к среде обитания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате пилотного исследования изменчивости фрагмента гена *cytb* мтДНК красных полевок в зоне влияния ВУРС показано, что внутривидовое разнообразие на импактном и прилежащем фоновом участках выше такового у животных с удаленной референтной территории. Наиболее высокие значения индексов генетического разнообразия наблюдались в зоне ВУРС и сопредельном участке, взаимосвязанных миграционными отношениями. Генетическая дифференциация исследуемых группировок в значительной степени обусловлена хроническим радиационным воздействием, которое можно рассматривать в качестве экологического фактора, способного повлиять на генетическое разнообразие населения мелких млекопитающих. Из полученных результатов также следует, что мтДНК можно использовать в качестве чувствительного маркера радиационного воздействия у мышевидных грызунов.

Получены уникальные данные о дальних миграциях *M. rutilus* на 9300–9500 м, что является наибольшими из известных на данный момент дистанций. Зверьки обоих полов разного функционального статуса преодолевали пространства,кратно перекрывающие поперечные размеры узкой и протяженной территории ВУРС. Зарегистрированные случаи касаются перемещений из зоны ВУРС на прилегающие территории, что свидетельствует об отсутствии пространственной изоляции между популяционными группировками. Очевидно, нерезидентные особи (мигранты) постоянно присутствуют в популяции красных полевок, которая стабильно существует за счет генетического обмена особей между группировками импактной и сопредельных территорий, чему способствует широкая распространенность и высокая подвижность вида. Пребывание животных в зоне ВУРС может иметь последствия для геномного профиля организма. При эффективном расселении, т. е. перемещении, имеющем генетические последствия [36], следствием дальних миграций является поток генов и сопряженная с ним трансгенерационная передача индуцированных радиацией биологических эффектов, что влияет на формирование генетического разнообразия у животных на сопредельных территориях. Таким образом, даже спустя 67 лет после Кыштымской аварии у грызунов, обитающих в зоне радиоактивного загрязнения, наблюдается высокий уровень мутационной изменчивости. Зона ВУРС может служить донором

генетического разнообразия для популяционных группировок грызунов, обитающих за пределами радиационного заповедника, и предоставляет возможность в естественных условиях исследовать долговременные биологические последствия радиационного воздействия. Логическая взаимосвязь между параметрами генетического разнообразия и миграциями животных из зоны загрязнения доказывает перспективность данного подхода – совместного использования экологических и молекулярно-генетических маркеров для целей биомониторинга при оценке эффектов техногенного/радиационного воздействия в зонах локального загрязнения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим канд. биол. наук О.В. Толкачеву за выявление метки и фотографии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Настоящая работа финансировалась за счет средств бюджета Института экологии растений и животных УрО РАН (№№ 122021000077–6, 122021000085–1). Дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации. Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

The authors declare no conflicts of interests.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Григоркина Елена Борисовна (Grigorkina Elena Borisovna), grigorkina@ipae.uran.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-87976211>;

Ракитин Сергей Борисович (Rakitin Sergey Borisovich), ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-55754681>;

Оленев Григорий Валентинович (Olenev Grigory Valentinovich), olenev@ipae.uran.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-88967915>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aarkrog A., Dahlgaard H., Nielsen S.P. et al. Radioactivity inventories from the Kyshtym and Karachay accidents: estimates based on soil samples collected in the South Urals (1990–1995). *Sci. Total Environ.* 1997;201:137–154.
2. Grigorkina E.B., Olenev G.V. Migrations of rodents in the zone of local radioactive contamination at different phases of population dynamics and their consequences. *Biol. Bull.* 2018;45(1):110–118. <https://doi.org/10.7868/S0002332918010150>
3. Grigorkina E.B. Olenev G.V. Radioadaptation of rodents in the zone of local radioactive contamination (Kyshtym Accident, Russia): 50 years on. *Radioprotection.* 2009;44(5):129–134. <https://doi.org/10/1051/radiopro/20095028>
4. Fisher P. Review of using Rhodamine B as a marker for wildlife studies. *Wildl. Soc. Bull.* 1999;27:318–329.
5. Толкачев О.В., Беспамятных Е.Н. Новый метод детекции родаминовой метки и возможности его применения в зоологических исследованиях. *Журнал СФУ. Биология.* 2019;12(4):352–365. [Tolkahev O.V., Bepamyatnykh E.N. The new method of rhodamine mark detection and its application possibilities in zoological studies. *Zhurnal Sibirskogo Federal'nogo Universiteta. Seriya Biologiya.* 2019;12(4):352–365 (In Russ)]. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0051>
6. Sram R.J. Future research directions to characterize Environmental mutagens in highly polluted areas. *Environ. Health Perspect.* 1996;104(3):603–607.
7. Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D.N. et al. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural population: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.* 2000;463:33–51.
8. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. *Генетика.* 2002;38(9):1173–1195. [Altuchov Yu.P., Salmenkova E.A. DNA polymorphism in population genetic. *Genetika.* 2002;38(9):1173–1195. (In Russ.)]
9. Geras'kin S.A., Volkova P.Y. Genetic diversity in Scots pine populations along a radiation exposure gradient. *Sci. Total Environ.* 2014;496:317–327. www.elsevier.com/locate/scitotenv
10. Животовский Л.А. Две ветви исследований популяционной структуры вида – экологическая и генетическая: история, проблемы, решения. *Генетика.* 2017;53(11):1244–1253. [Zhivotovsky L.A. Two branches – ecological and genetic – in studying the species population structure: history, problems, and solutions. *Genetika.* 2017;53(11):1244–1253. (In Russ.)]
11. Газиев А.И., Подлущий А.Я. Низкая эффективность систем репарации ДНК в митохондриях. *Цитология.* 2003;Т. 45(4):403–417. [Gaziev A.I., Podlutsky A.Ya. Low efficiency of DNA repair systems in mitochondria a review. *Tsitologia.* 2003;45(1):403–417. (In Russ.)]

12. 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. Chem.* 2001;20(2):317–326.
13. Baker R.J., Dickins B., Wickliffe J.K. et al. Elevated mitochondrial genome variation after 50 generations of radiation exposure in a wild rodent. *Evolut. Applicat.* 2017;10:784–791.
14. Molchanova I., Mikhailovskaya L., Antonov K. et al. Current assessment of integrated content of long-lived radionuclides in soils of the head part of the East Ural Radioactive Trace. *J. Environ. Radioact.* 2014;138(6):238–248.
www.elsevier.com/locate/jenvrad
15. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Acids Res.* 1997;25(22):4692–4693.
16. Ракитин С.Б., Копориков А.Р., Богданов В.Д. и др. Изменчивость микросателлитной ДНК налима (*Lota Lota*) Обь-Иртышского бассейна: тестирование праймеров и оптимизация методики. *Вестн. АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство.* 2013;3:118–128. [Rakitin S. B., Koporikov A. R., Bogdanov V. D. et al. Variation of microsatellite DNA of burbot (*Lota Lota*) of the Ob-Irtysh basin: testing of primers and optimization if the method. *Vestnik AGTU. Seria: Rybnoe khozyaistvo.* 2013(3):118–128. (In Russ.)]
17. Абрамсон Н.И., Родченкова Е.Н., Костыгов А.Ю. Генетическая изменчивость и филогеография рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*, Arvicolinae, Rodentia) на территории России с анализом зоны интродукции мтДНК близкородственного вида – красной полевки (*Cl. rutilus*). *Генетика.* 2009;45(5):610–623. [Abramson N.I., Rodchenkova E.N., Kostygov A.Yu. Genetic variation and phylogeography of bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Arvicolinae, Rodentia) in Russia with special reference to the introgression of the mtDNA of a closely related species, red backed vole (*Cl. rutilus*). *Genetica.* 2009;45(5):610–623. (in Russ.)]
18. Hall T.A. Bio-Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Sympos. Ser.* 1999;41:95–98.
19. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molec. Biol. Evolut.* 2011;28(10):2731–2739.
20. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resources.* 2010;10:564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
21. Olenev G.V. Determining the age of cyclomorphic rodents: functional–ontogenetic determination, ecological aspects. *Rus. J. Ecol.* 2009; 40(2):93–104.
<https://doi: 10.1134/S1067413609020040>
22. Jacob J., Jones D.A., Singleton G.R. Retention of the bait marker Rhodamine B in wild house mice. *Wildl. Res.* 2002;29:159–164.
23. Kozakiewicz M., Chołuj A., Kozakiewicz A. Long-distance movements of individuals in a free-living bank vole population: an important element of male breeding strategy. *Acta Theriologica.* 2007;52(4):339–348.
24. Howard W.E. Innate and environmental dispersal of individual vertebrates. *American Midland Naturalist.* 1960;63:152–161.
25. Fichet-Calvet E. Persistence of a systemic labelling in fur and guard hairs by ingestion of rhodamine B in *Myocastor coypus* (Rodentia). *Mammalia.* 1999;63:241–244.
26. Lidicker W.Z. Jr. Dispersal. The American Society of Mammalogists. Spec. Public. 1985;8:420–454.
27. Щипанов Н.А., Купцов А.В. Нерезидентность у мелких млекопитающих и ее роль в функционировании популяции. *Успехи современной биологии.* 2004;124(1): 28–43. [Shchipanov N.A., Kuptsov A.V. Nonresidence in small mammals and its role in the functioning of populations. *Uspekhi sovremennoi biologii.* 2004;124(1):28–43. (In Russ.)]
28. Malinovsky G.P., Yarmoshenko I.V., Starichenko V.I. et al. Assessment of radiation exposure of murine rodents at the EURT territories. *Centr. Eur. J. Biol.* 2014;9(10):960–966.
<https://doi: 10.2478/s11535-014-0321-2>
29. Sources effects and risks of ionizing radiation. UNSCEAR 2008 Report to General Assembly with Scientific Annexes. New York: UNSCEAR. 2011. 219 p.
30. Григоркина Е.Б., Пашнина И.А. К проблеме радиоадаптации мелких млекопитающих (экологическая специализация вида, радиорезистентность, гемопоэз, иммунитет). *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2007;47(3): 371–378. [Grigorkina E.B., Pashnina I.A. On the Problem of Radioadaptation in Small Mammals (Ecological specialization of a species, radioresistance, hemopoiesis, immunity). *Radiatsionnaya Biologiya. Radioecologiya.* 2007;47(3):371–378. (In Russ.)]
31. Yalkovskaya 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;56(1):140–144.
<https://doi:10.1134/S0006350911010258>
32. May A., Bohr V.A. Gene-specific repair of gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells no coupling to transpiration and no removal from the mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;269: 433–437.
33. Chung H.C., Kim S.H., Lee M.C. et al. Mitochondrial dysfunction by gamma irradiation accompanies the induction of cytochrome P450 2 EI (CYP2EI) in rat liver. *Toxicology.* 2001;161:79–91.
34. Rakitin S.B., Grigorkina E.B., Olenev G.V. Analysis of microsatellite DNA in rodents from Eastern Urals

- radioactive trace zone and contiguous territories. *Rus. J. Genet.* 2016;52(4):398–404.
[https://doi: 10.1134/S1022795416030121](https://doi.org/10.1134/S1022795416030121)
35. Gileva E.A., Lyubashevskii N.M., Starichenko V.I. et al. Hereditary chromosome instability in common vole (*Microtus arvalis*) from the region of the Kyshtym Nuclear Meltdown: fact or hypothesis? *Rus. J. Genetics.* 1996;32(1):99–104.
36. Ronce O. How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2007;38:231–253.

Eastern-Urals Radioactive Trace as a Source of Genetic Diversity in Rodents Populations at Adjacent Territories

© 2024 г. Е. В. Grigorkina^{1, *}, S. B. Rakitin, G. V. Olenev¹

¹*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia*

^{*}*e-mail: grigorkina@ipae.uran.ru*

Firstly, polymorphism of gene cytochrome *b*' (*cytb*) fragment of mitochondrial DNA (mtDNA) and migratory activity of red-backed voles (*Myodes rutilus* Pallas, 1779) at zone of local radioactive pollution – Eastern-Urals radioactive trace zone (EURT) are investigated. More high haplotype diversity in both samples from EURT zone and adjacent background territory (9–10 km) as compared with the reference one (220 kms) was found. Moreover nucleotide diversity and average number of pair distinctions between haplotypes were greatest in voles from contiguous site with background radiation level. Our hypothesis about association genetic diversity with rodents' migrations from EURT zone were verified in field experiments employing group marking of population by biomarker rhodamine B. Migrants (males and females) of different functional status at background sites were revealed. Long-distance movements (9500 m) are maximal known for *M. rutilus*. EURT zone is a source of genetic diversity in rodents populations on adjacent territories due to interpopulation gene flows patterns (radiation-induced effects) carrying by migrants. MtDNA can be served as an effective biomarker of radionuclide exposure in natural environment. Combining usage of ecological and molecular biomarkers is expediently for monitoring in rodents inhabiting zones of local radionuclides pollution.

Keywords: EURT, cytochrome *b* of mitochondrial DNA, rodents, migration, group marking, rhodamine B