

# ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОФОНДОВ РЕДКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ВИДА *ADONIS VERNALIS* L. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МАРКЕРОВ

**С.В. БОРОННИКОВА (фото),**

кандидат биологических наук, доцент,

**Н.Н. ТИХОМИРОВА (фото),**

аспирант,

**О.А. КРАВЧЕНКО,**

студент, Пермский государственный университет, г. Пермь

**Ключевые слова:** *генофонд, ISSR-маркеры, полиморфизм, генетическое разнообразие.*

## Цель и методика исследований

Количественное определение запаса генетической изменчивости видов и популяций является основой устойчивости и селекционного потенциала популяций [1]. Одним из подходов к изучению сложных геномов растений является использование молекулярных маркеров, представляющих собой полиморфные последовательности ДНК, которые могут быть обнаружены с помощью методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полиморфизм нуклеотидных последовательностей между отдельными образцами ДНК выявляется по присутствию или отсутствию конкретных полос в спектре фрагментов ДНК при электрофорезе. Отсутствие полосы может быть следствием точечных мутаций, вставок, делеций или инверсий в последовательности ДНК-матрицы. С введением молекулярных маркеров в практику биологических исследований появились новые

возможности изучения генетического разнообразия, определения родства на внутри- и межвидовом уровне [2].

Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к этим генам. На этой особенности основан ISSR-метод (Inter-Simple Sequence Repeat), в котором используется один или несколько праймеров длиной в 15-24 нуклеотида. В данном случае праймеры состоят из тандемных коротких 2-4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера [3]. ISSR-метод не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров и хорошо воспроизводим в строгих условиях реакции.

Цель нашей работы – провести анализ генетической изменчивости редкого лекарственного вида растений *Adonis vernalis* L. на популяционном уровне.



В качестве объектов исследований был избран редкий лекарственный и декоративный вид растений Пермского края из семейства *Ranunculaceae* Juss. – *A. vernalis* с категорией угрожаемого состояния 3 (R) [4, 5].

Сбор материала проведен в 2006-2008 годах, молекулярно-генетический анализ – в 2006-2009 годах. Исследования велись на уровне ценопопуляций, то есть конкретных популяций, расположенных в пределах данного фитоценоза. Исследованы шесть ценопопуляций *A. vernalis* Пермского края. Первая ценопопуляция (Av1) расположена к югу от с. Орда Ординского района, вторая (Av2) – на Спасской горе около с. Плеханово Кунгурского района, третья (Av3) – около дер. Мерекай Ординского района, четвертая (Av4) – около дер. Иштерьяки, пятая (Av5) – около с. Богородск, шестая (Av6) – около дер. Ишимово Октябрьского района. Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма ДНК *A. vernalis* были собраны листья с 30 случайно выбранных растений в каж-

***Gene pool, ISSR-markers, polymorphism, genetic diversity.***

дой ценопопуляции на расстоянии от 30 до 50 м друг от друга. Для выделения ДНК использовали методику А.М. Торрес и др. [6] с незначительными модификациями. При выделении ДНК брали навески по 100 мг из свежесобранных листьев.

Амплификацию проводили в термодинамическом цикле «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», г. Москва) и MJ MiniCycler (Biorad, США) для ISSR-анализа по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; t отжига, 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при 72eC. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 56 до 60°C. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,5-процентном агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длин фрагментов ДНК использо-

вали маркер молекулярной массы (100 bp+1,5+3 Kb DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», г. Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One 4.6.2.

Для проведения молекулярно-генетического анализа была выделена ДНК из 180 образцов листьев. Фрагменты листьев были собраны в шести ценопопуляциях на территории трех районов Пермского края. Анализ полиморфизма ДНК проведен у 900 проб ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ISSR-метода.

Для количественной оценки степени полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными ценопопуляциями полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в ISSR-спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось соответственно как состояние 1 или 0. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагмен-

ты. Полиморфизм по интенсивности не брали в расчет.

Проведен компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК с помощью компьютерной программы PopGen32 и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel с определением доли полиморфных локусов (при P=0,95), общего числа аллелей (n<sub>a</sub>), эффективно-го числа аллелей (n<sub>e</sub>) [7], ожидаемой гетерозиготности (He) [8]. Для оценки генетического разнообразия внутри и между популяциями была выбрана информационная мера Шеннона [9], традиционно применяемая для оценки генетического разнообразия редких видов растений на популяционном уровне [10]. Индекс разнообразия Шеннона рассчитывали для каждой ценопопуляции (H<sub>i</sub>), среднее значение для популяций (H<sub>pop</sub>) и для суммарной выборки (H<sub>sp</sub>); на основе этих значений определяли долю внутри- и межпопуляционного разнообразия. В качестве показателей оценки генетического разнообразия мы использовали следующие параметры: общее генное разнообразие в суммарной выборке (H<sub>T</sub>), среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам (H<sub>S</sub>) и показатель подразделенности популяций (G<sub>ST</sub>) [8, 11]. Генетическое расстояние между особями и ценопопуляциями определяли по формуле М. Nei [11, 12]. Статистическая обработка данных проведена по методике Л.А. Животовского [13] и Г.Ф. Лакина [14].

#### Результаты исследований

У редкого лекарственного вида *A. vernalis* изучено генетическое разнообразие в шести ценопопуляциях Пермского края, из которых три были изучены ранее в меньшем объеме [15]. Выявление полиморфизма длин амплификационных фрагментов ДНК, получаемых в результате ПЦР, проведено с использованием полиморфизма межмикросателлитной ДНК (ISSR-метод). В шести изученных ценопопуляциях *A. vernalis* выявлено 109 амплифицированных фрагментов ДНК, 100 из которых были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов ДНК в суммарной выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 19 (M9) до 29 (M12). У этих праймеров отмечены соответственно самые низкие и высокие значения доли полиморфных локусов (табл. 1).

В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 22 фрагментов ДНК. Число полиморфных фрагментов в суммарной выборке растений *A. vernalis* варьировало от 16 до 29, а их размеры - от 210 до 1900 пн (рис. 1). Уровень полиморфизма в суммарной выборке в зависимости от ISSR-праймера колебался от 80 до 100% и в среднем составил 91,74%.

Число выявленных амплифицированных фрагментов ДНК варьировало по популяциям от 66 (Av2) до 92

Таблица 1  
Характеристика праймеров и амплифицированных ими фрагментов ДНК

ISSR-праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размеры фрагментов, пн	Число фрагментов	
			учитываемых	полиморфных
M1	(AC) <sub>8</sub> CG	280-1900	20	19 (0,9500)
M3	(AC) <sub>8</sub> CT	200-1700	21	19 (0,9048)
M9	(GAC) <sub>4</sub>	250-1550	19	17 (0,9847)
M12	(CA) <sub>6</sub> G	210-1760	29	29 (1,0000)
X11	(AGC) <sub>6</sub> G	270-1800	20	16 (0,8000)
Всего			109	100 (0,9174)

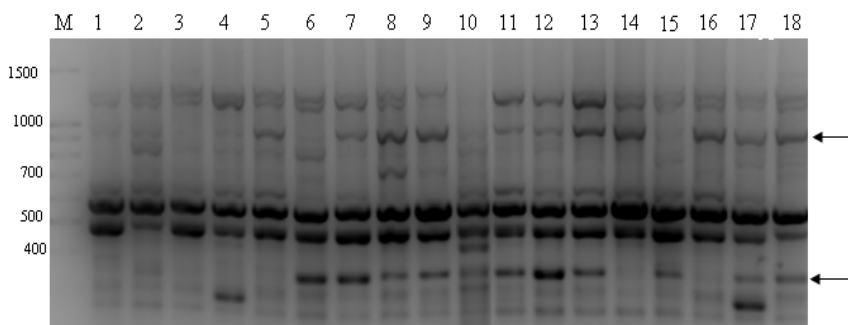


Рисунок 1. ISSR-спектр 18 особей ценопопуляции *A. vernalis* (Av4) с праймером X11: цифрами обозначены номера проб; M – молекулярный маркер; стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты ДНК

Таблица 2

Показатели генетического разнообразия в ценопопуляциях *A. vernalis*

	Av1	Av2	Av3	Av4	Av5	Av6	На выборку
n	73	66	72	84	84	92	109
P	49 (0,4495)	38 (0,3486)	44 (0,4037)	67 (0,6147)	63 (0,5780)	68 (0,6239)	100 (0,9174)
R	4 (0,0367)	7 (0,0642)	5 (0,0459)	0 (0,0000)	4 (0,0367)	8 (0,0734)	5 (0,0459)
n <sub>a</sub>	1,4954 (0,5023)	1,4312 (0,4975)	1,4587 (0,5006)	1,6514 (0,4787)	1,6330 (0,4842)	1,7339 (0,4439)	1,9725 (0,1644)
n <sub>e</sub>	1,2355 (0,3117)	1,1997 (0,3144)	1,2251 (0,3124)	1,4230 (0,3909)	1,3798 (0,3772)	1,3894 (0,3621)	1,5210 (0,3160)
He	0,1469 (0,0170)	0,1217 (0,0167)	0,1393 (0,0183)	0,2425 (0,0195)	0,2215 (0,0193)	0,2316 (0,0185)	0,3129 (0,0140)

Примечание: n – число выявленных амплифицированных фрагментов ДНК; P – число полиморфных фрагментов ДНК (в скобках указана их доля); R – число редких фрагментов (в скобках указана их доля); n<sub>a</sub> – абсолютное число аллелей на локус (в скобках даны стандартные отклонения); n<sub>e</sub> – эффективное число аллелей на локус (в скобках даны стандартные отклонения); He – ожидаемая гетерозиготность (в скобках даны стандартные отклонения).

(Av6) (табл. 2). Уровень полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК *A. vernalis*, полученных в результате ПЦП со всеми ISSR-праймерами, колебался от 34,86% в Av2 до 62,39% в Av6. Количество редких фрагментов ДНК (с частотой  $\leq 0,05$ ) варьировало по популяциям от 0 (Av4) до 8 (Av6). В среднем на выборку их число составило 5 (4,6%). Самой распространенной мерой генетической изменчивости в популяции является гетерозиготность. Теоретически гетерозиготность распределяется в популяции сложным образом, а величины гетерозиготности не слишком зависят от количества аллелей [7].

Функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на locus и выравнивания частот аллелей является эффективное число аллелей ( $n_e$ ) и, таким образом, оно является мерой генетического разнообразия популяции или вида. Эффективное число аллелей оценивает величину, обратную гомозиготности, и представляет собой такое число аллелей, при одинаковой частоте которых в популяции гетерозиготность будет равна фактической. Абсолютное число аллелей на locus (в нашем случае – на фрагмент ДНК) на общую выборку *A. vernalis* составило 1,97. Эффективное число аллелей на locus ( $n_e$ ) на общую выборку равно 1,52. Ожидаемая гетерозиготность по locusам в общей выборке *A. vernalis* составила 0,31. Эти показатели наиболее высоки в Av4, а минимальны – в Av2 (табл. 2).

Общее генное разнообразие в суммарной выборке ( $H_T$ ), предложенное М. Nei [7] и представляющее собой гетерозиготность, на всю выборку составило 0,3129. Среднее выборочное генное разнообразие по всем locusам ( $H_S$ ), являющееся средней гетерозиготностью, по популяциям со-

ставляло 0,1839. Таким образом, средняя гетерозиготность *A. vernalis* в изученных ценопопуляциях ниже, чем в суммарной выборке. Коэффициент подразделенности ценопопуляций ( $G_{ST}$ ) показывает, что на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия *A. vernalis* приходится 41,22% разнообразия.

Оценка внутри- и межпопуляционного разнообразия была проведена также на основе информационного индекса Шеннона. Среднее значение индексов разнообразия Шеннона в изученных ценопопуляциях *A. vernalis*, рассчитанное по ISSR-праймерам, составило 27,84% (табл. 3). Выше этот показатель в Av4. Индекс Шеннона, рассчитанный на общую выборку *A. vernalis*, равен 47,68%. На долю внутрипопуляционного генетического разнообразия *A. vernalis* приходится 58,40%, а на долю межпопуляционного – 42,61%.

Таким образом, оба подхода к определению генетического разнообразия, то есть определение показателя подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) и коэффициента Шеннона, дали близкие результаты у изученного вида. При изучении ресурсных видов растений можно рекомендовать оба подхода, но, на наш взгляд, определение показателя подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ), предложенный М. Nei [8], более приемлем для видов, имеющих большую численность популяций, а определение индекса Шеннона – для редких видов растений с минимальной численностью популяций.

Наименьшее генетическое расстояние между исследуемыми ценопопуляциями *A. vernalis*, рассчитанное по М. Nei [11], отмечено между Av2 и Av6 (0,1096); наиболее генетически удаленными являются ценопопуляции Av1 и Av4 (0,3052). На дендрограмме попу-

ляции *A. vernalis* сформировали 6 кластеров, соответствующие исследованным ценопопуляциям; узлы ветвления имеют высокую поддержку (индекс бутстреп  $> 50\%$ ) (рис. 2).

Таким образом, самые низкие показатели генетического разнообразия отмечены во второй ценопопуляции *A. vernalis* (Av2), расположенной на Спасской горе Кунгурского района ( $P=34,86\%$ ;  $H_0=0,18$ ;  $H_e=0,12$ ) (рис. 2), а самые высокие показатели – в Av4 ( $P=61,47\%$ ;  $H_0=0,35$ ;  $H_e=0,24$ ) и Av6 ( $P=62,39\%$ ;  $H_0=0,35$ ;  $H_e=0,23$ ).

#### Выводы. Рекомендации

На основании анализа фрагментов ДНК, амплифицированных в результате ПЦП с использованием ISSR-праймеров, установлено, что изученные шесть ценопопуляций *A. vernalis* характеризуются высоким уровнем полиморфизма ДНК ( $P_{95}=91,74\%$ ). Большая часть генетической изменчивости (58,4%) является внутривидовой. Ожидаемая гетерозиготность на общую выборку составила 0,31. На общую выборку были выявлены 5 редких амплифицированных фрагментов ДНК.

Самые низкие показатели генетического разнообразия отмечены в ценопопуляции Кунгурского района, расположенной на Спасской горе (Av2), а количество редких молекулярных маркеров здесь одно из самых высоких в изученных ценопопуляциях, что заставляет вместе с средней степенью антропогенного влияния проводить обязательные меры охраны и мониторинга для предотвращения дальнейшего снижения численности особей и генетического разнообразия.

Самые высокие показатели генетического разнообразия отмечены в ценопопуляциях Октябрьского района. В популяции, расположенной около дер. Ишимово (Av6) – наибольшее количество выявленных амплифицированных фрагментов ДНК и количество редких молекулярных маркеров, что говорит о высокой ценности данной популяции для сохранения генетического разнообразия данного вида.

На основании комплексного анализа полученных данных мы рекомендуем следующие меры охраны и мониторинга исследованных популяций *A. vernalis*:

1) поддержание оптимальной численности ценопопуляций путем устранения антропогенного воздействия (вытапывание, сбор цветущих растений, пожары);

2) ежегодное отслеживание изменений популяционных характеристик и регулярный мониторинг показателей генетической гетерогенности ценопопуляций;

3) для получения лекарственного сырья и срезки на букеты необходимо использовать только выращенные в культуре растения.

Таким образом, проведенные нами исследования выявили неоднород-

Таблица 3  
Генетическое разнообразие внутри и между ценопопуляциями *A. vernalis* (по индексу Шеннона)

	$H_0$						$H_{sp}$	$H_{pop}$	$H_{pop}/H_{sp}$	$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$
	Av1	Av2	Av3	Av4	Av5	Av6				
M1	0,1042	0,1948	0,3134	0,4592	0,2536	0,2000	0,4422	0,2542	0,5749	0,4251
M3	0,2331	0,2988	0,1479	0,2817	0,2631	0,3609	0,4704	0,2643	0,5618	0,4382
M9	0,1895	0,1595	0,2084	0,3638	0,4151	0,3989	0,4951	0,2892	0,5841	0,4159
M12	0,2361	0,1171	0,1293	0,3221	0,3579	0,3675	0,5023	0,2550	0,5070	0,4923
X11	0,3674	0,1966	0,3134	0,3894	0,3579	0,4233	0,4636	0,3413	0,7363	0,2637
Среднее	0,2275	0,1883	0,2143	0,3591	0,3305	0,3512	0,4768	0,2784	0,5840	0,4161

Примечание:  $H_0$  – индекс разнообразия Шеннона для ценопопуляций;  $H_{sp}$  – индекс разнообразия Шеннона для суммарной выборки;  $H_{pop}$  – среднее значение индекса разнообразия Шеннона для ценопопуляций;  $H_{pop}/H_{sp}$  – внутривидовое разнообразие;  $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$  – межпопуляционное разнообразие.

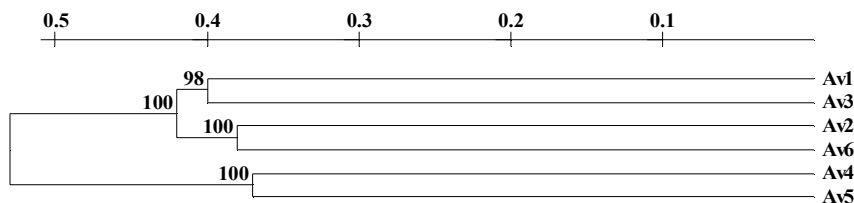


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная UPGMA-методом по ISSR-праймерам шести ценопопуляций *A. vernalis*: шкала сверху – генетические дистанции по М. Nei (1979); на дендрограмме цифрами указаны значения бутстреп (в %)

**Биология. Рыбоводство**

ность генофондов редкого лекарственного вида *Adonis vernalis* L. Полученные данные необходимо учитывать

при разработке мер охраны и мониторинга популяций этого вида.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант №07-04-96032).*

**Литература**

1. Политов Д. Требуется изучение геномов лесных древесных растений // Лесная Россия. 2008. № 1. С. 14-18.
2. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика. 2005. Т. 41. № 4. С. 480-490.
3. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176-183.
4. Красная книга Среднего Урала (Свердловская и Пермская области): редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 1996. 279 с.
5. Красная книга Пермского края / науч. ред. А. И. Шепель. Пермь : Книжный мир, 2008. 256 с.
6. Torres A. M., Weeden N. F., Martin A. Linkage among sozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 5. P. 937-945.
7. Хедрик Ф. Мир биологии: генетика популяций / пер. с англ. А. А. Лушниковой, Н. В. Петровой. М. : Техносфера, 2003. 592 с.
8. Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y. : Columbia Univ. press, 1987. P. 176-187.
9. Chalmers K. J., Waugh R., Sprent J. I. et al. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers // Heredity. 1992. V. 69. P. 465-472.
10. Артюкова Е. В., Холина А. Б., Козыренко М. М. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD-маркеров // Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С. 877-884.
11. Nei M. Genetic distance between populations // Amtr. Natur. 1972. Vol. 106. P. 283-292.
12. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269-5273.
13. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Общая генетика. М. : ВИНТИ АН СССР. 1983. Т. 8. С. 76-104.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия : уч. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М. : Высш. шк., 1990. 352 с.
15. Тихомирова Н. Н., Боронникова С. В., Кокаева З. Г., Гостимский С. А. Генетический полиморфизм лекарственных растений : м-лы I (IX) Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге. 21-26 мая 2006. СПб. : Изд-во ГЭТУ, 2006. С. 37.