

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *POA PRATENSIS L.* В УСЛОВИЯХ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ IRAP-МАРКЕРОВ

Н.М. ДЕВЯТОВА (фото),

студент,

Н.Н. БЕЛТЮКОВА,

Т.Н. СВЕТЛАКОВА,

аспиранты,

А.В. СУСЛОВ,

соискатель, Пермский государственный университет

А.В. НАЗАРОВ (фото),

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Ключевые слова: нефтяное загрязнение почвы, *Poa pratensis L.*, IRAP-метод, полиморфизм IRAP-маркеров, генетическое разнообразие.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 07-04-96016-р_урал_a.

Цель и методика исследований

Вследствие своей производственной и энергетической значимости нефть играет важную роль в жизни человечества. Но вместе с тем увеличивается и количество нефтяных загрязнений. Опасность данного загрязнителя прежде всего связана с высокой чувствительностью к нему высших растений, притом что они занимают ключевое положение практически во всех наземных экосистемах, определяя существование и состав остальных биологических компонентов биогеоценозов. На чувствительности высших растений основаны методы биоиндикации окружающей среды. Такие методы позволяют оценить комплексное влияние загрязнителей на среду.

Методы и критерии оценки влияния нефтяного загрязнения на растения довольно разнообразны. В области изучения влияния загрязнения нефтью на

полиморфизм ДНК растений интересным является использование ретротранспозонов в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (PCR). Известно, что в растениях мобильные элементы составляют более половины ДНК [1]. В качестве повторяющихся последовательностей ретротранспозоны рассеяны по всему геному; в связи с этим они удобны для ДНК-генотипирования растений [2].

Сбор материала для изучения влияния нефтяного загрязнения на растения производился на опытном стационаре Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь) в дер. Ключи Добрянского района Пермского края. Экспериментальные площадки были заложены в дерново-подзолистой почве злаково-разнотравного лугового биоценоза. В 1996 и 1999 годах площадки площадью 1 м² были перекопаны с уборкой растительности и залиты не-

614990, г. Пермь,

ул. Букирева, д. 15;

тел.: 8-9048447803,

8-9226440847;

e-mail: natashi4-vyatka@yandex.ru,

nttihomirova@mail.ru



614081, г. Пермь,

ул. Голева, д. 13;

тел. 8-9504440888;

e-mail: nazarov@iegm.ru

фтью концентрацией 24 л/м². Также для исследования был взят материал с контрольных площадок.

На этих же экспериментальных площадках проводились исследования структуры и разнообразия микробных сообществ. Описано изменение качественного и количественного состава микроорганизмов, влекущее за собой изменения в микробно-растительных взаимодействиях. Разработаны рекомендации по биорекультивации нефтезагрязнённых почв.

Для исследования был выбран распространённый в луговых сообществах вид *Poa pratensis L.* из семейства *Poaceae*. Злаки относятся к одним из наиболее устойчивых по сравнению с остальными растениями. Вид был представлен на всех площадках разного года загрязнения, а также на

***Oily soils, Poa pratensis L.,
IRAP-method, IRAP-markers
polymorphism, genetic
diversity.***

контрольных площадках.

Целью нашей работы являлось непосредственное изучение генетического разнообразия растений, произрастающих в условиях нефтезагрязнённых почв, с применением IRAP-метода на примере *P. pratensis*.

Для разработки и апробации методики молекулярно-генетического анализа из листьев *P. pratensis* была выделена ДНК. Всего было взято 90 особей *P. pratensis*: 30 особей с площадок 1996 года, 30 – с площадок 1999 года и 30 особей – с контрольных площадок, не загрязнённых нефтью. Для выделения ДНК брали пробы из 100 мг листьев по методике [2] с незначительными модификациями.

При исследовании генетического разнообразия растений был избран IRAP-метод (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism). IRAP-метод представляет собой анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между ретротранспозонами. Ретротранспозоны – мобильные генетические элементы, широко распространённые в геномах эукариот. В некоторых случаях число их копий может составлять более 70% ядерного генома [3]. Для создания праймеров использовались последовательности LTR (Long Terminal Repeats – длинные концевые повторы).

Амплификация проводилась с использованием 5 IRAP-праймеров в термоциклерах «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», г. Москва) и MJ Mini Cycler (Bio-Rad, USA). Всего была проведена амплификация 450 проб ДНК. Продукты амплификации разделяли путём электрофореза в 2,0%-ном агарозном геле в 1х TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды.

Для определения длины фрагментов ДНК использовали 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 в системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA).

Для проведения компьютерного анализа молекулярно-генетического полиморфизма были использованы программа Popgen32 и макрос GenAlEx6. Па-

раметры, взятые для исследования: доля полиморфных локусов ($p_{0,95}$), общее число аллелей (n_a), эффективное число аллелей (n_e), ожидаемая гетерозиготность (H_e) [4]. Уровень внутрипопуляционного разнообразия оценен через показатели среднего числа морф (μ) и доли редких морф (h) [5].

Достоверность различий между показателями генетической изменчивости определялась по критериям Стьюдента, Фишера и Уилкоксона при уровне достоверности 0,95 [6].

Результаты исследований

Для проведения анализа генетической изменчивости растений при нефтяном загрязнении на примере *P. pratensis* рекомендуется методика выделения ДНК [2] с применением СТАВ, которая позволила выделить ДНК без примесей фенолов. Для амплификации ДНК отобраны 5 наиболее информативных IRAP-праймеров из 20, синтезированных в ЗАО «Синтол» и ЗАО «Евроген» (г. Москва).

При амплификации ДНК *P. pratensis* с 5 IRAP-праймерами было выявлено 77 фрагментов ДНК. С помощью одного IRAP-праймера в среднем было амплифицировано 15 фрагментов ДНК (рис.). Число амплифицированных фрагментов ДНК на праймер варьировало от 11 (праймер 2159) до 21 (праймер 2165) (табл. 1). Число амплифицированных фрагментов ДНК *P. pratensis* с каждым из праймеров по годам загрязнений и в контроле было одинаковым. Амплифицированные фрагменты ДНК были отнесены к мономорфным, если частота их встречаемости была $>0,95$. Фрагменты с меньшей частотой встречаемости были отнесены к полиморфным. Доля полиморфных фрагментов ДНК оказалась достоверно выше в контрольных образцах по сравнению с образцами, взятыми с опытных площадок ($p_{0,95} < 1,96$).

Матрицы бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в IRAP-спектрах одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось соответственно как состояние 1 или 0, были обработаны в компьютерных программах Popgen32 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS Excel для определения показателей генетического разнообразия (табл. 2).

Предпринята попытка оценки генетического разнообразия в исследуемых выборках посредством показателям μ -

среднее число морф в выборке. Исходными данными для этого анализа являются частоты морф (в нашем случае – частоты проявления фрагмента ДНК). Наряду со средним числом морф определена доля редких морф (h). Этот показатель даёт новую в сравнении с μ информацию о характере генразнообразия. В то время как μ даёт оценку степени разнообразия выборки, показатель h оценивает структуру этого разнообразия (табл. 2). Достоверность отличий между показателями μ и h оценивали с помощью u -критерия [5]. Значение μ для контрольных образцов оказалось достоверно выше значения μ для образцов, взятых с площадок 1996 года загрязнения, и недостоверно выше μ образцов, взятых с площадок 1999 года загрязнения. Значения этого показателя для площадок разной давности загрязнения оказались различными на достоверно значимом уровне ($u > 1,96$). Значения показателя h на контрольных и опытных площадках отличаются на уровне ниже достоверно значимого.

Функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на локус и выравниваемости частот аллелей является эффективное число аллелей (n_e). Таким образом, оно является мерой генетического разнообразия. Эффективное число аллелей оценивает величину, обратную гомозиготности, и представляет собой такое число аллелей, при одинаковой частоте которых гетерозиготность будет равна фактической. Абсолютное и эффективное число аллелей на локус (в нашем случае – на фрагмент ДНК) оказались недостоверно выше в контрольных образцах (табл. 2).

Выводы. Рекомендации

Таким образом, в нашем исследовании уровня генетического разнообразия *P. pratensis* с 5 IRAP-праймерами мы выявили повышенные значения показателей генразнообразия у особей *P.*

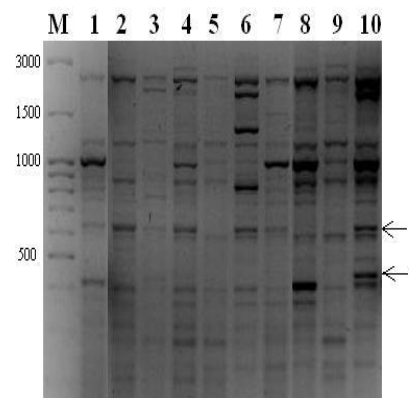


Рисунок. IRAP-спектр особей *Poa pratensis* L. с праймером 2165, произрастающих на экспериментальных площадках 1999 г. Цифрами обозначены номера проб. М – маркер молекулярного веса. Стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты

Таблица 1
Характеристика амплифицированных фрагментов ДНК *P. pratensis* при нефтяном загрязнении почв

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Размеры фрагментов	Число амплифицированных фрагментов ДНК	Доля полиморфных фрагментов		
				1996 г.	1999 г.	контроль
X5	GGA ATG ATA GGC CTT GCC	460-2720	13	0,9231	0,8461	0,9231
2151	ACA ACT CCA CGC TTG TCC GCT CC	180-1100	12	0,7500	0,6667	0,8333
2159	AGC GAA TCA ACA GGG GCT GCC CGA	250-1370	11	0,8182	0,8182	0,8182
2165	GTTCTCCTTACTAGCCGATGTGGGA	370-2680	21	0,7000	0,8000	0,8500
2182	GTGTCTTTCACATAGGTTAGAGGACC	260-3230	20	0,8095	0,8095	0,8571
Всего			77	0,8002	0,7881	0,8563

pratensis контрольных площадок по сравнению с особями площадок, загрязнённых нефтью в 1996 и 1999 годах, на недостоверно высоком уровне. На данных особях, произрастающих на тех же экспериментальных площадках, также были проведены исследования на выявление изменений уровня генразнообразия с применением ISSR-метода (Inter-Simple Sequence Repeat) (работа в печати). В данных исследованиях при использовании двух разных методов изучались разные участки генома *P. pratensis*. Были получены схожие закономерности при разных уровнях достоверности: показатели генетического разнообразия выше у образцов *P. pratensis* контрольных площадок по сравнению с об-

Таблица 2
Сравнение показателей генетического разнообразия *P. pratensis* в условиях нефтяного загрязнения почв

Давность загрязнения	n_a	n_e	H_e	Показатели разнообразия	
				μ	h
1996 г.	1,8442 (0,3651)	1,5881 (0,3405)	0,336 (0,019)	1,7388 (0,0300)	0,1308 (0,0152)
1999 г.	1,8312 (0,3771)	1,6312 (0,3491)	0,360 (0,019)	1,6028 (0,0348)	0,1512 (0,0178)
Контроль	1,8571 (0,3522)	1,6356 (0,3307)	0,375 (0,016)	1,7662 (0,0278)	0,1171 (0,0140)

Примечание: n_a – абсолютное число аллелей на locus; n_e – эффективное число аллелей на locus; H_e – ожидаемая гетерозиготность; в скобках даны стандартные отклонения; μ – среднее число морф; h – доля редких морф.

разцами, взятыми с площадок, загрязнённых нефтью в 1996 и 1999 годах, на достоверно значимом уровне с исполь-

зованием ISSR-метода и на уровне ниже достоверно значимого при применении IRAP-метода.

Литература

1. Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 8. С. 15-21.
 2. 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.
 3. Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 479-532.
 4. Kimura M., Crow J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics (US). 1964. V. 49. P. 725-738.
 5. Животовский Л. А. Показатель внутривидового разнообразия // Журнал общей биологии. 1980. Т. 41. № 6. С. 828-836.
- Лакин Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. Изд. 4-е, перераб. и доп. М. : Высшая школа, 1990. 352 с.