

Генетическое разнообразие локальных популяций кровохлебки лекарственной *Sanguisorba officinalis* L. из окрестностей Карабашского медеплавильного комбината¹

Урал является одним из крупнейших регионов по величине разведанных и прогнозируемых запасов полезных ископаемых, что предопределяет интенсивное развитие таких видов промышленности, как черная и цветная металлургия, химическое производство, добыча полезных ископаемых. В окрестностях подобных предприятий, существующих многие десятки лет, произошла существенная трансформация экосистем, исчезли многие виды растений. Одним из наиболее ярких примеров таких изменений может служить антропогенная пустыня в г. Карабаш Челябинской области. Популяции растений, произрастающих в подобных условиях в течение многих лет, по-видимому, смогли адаптироваться к условиям стресса. Исследование было направлено на изучение уровня генетического разнообразия двух субпопуляций кровохлебки лекарственной *Sanguisorba officinalis* L. (семейство Rosaceae), произрастающих в местообитаниях с разным уровнем техногенной нагрузки.

Материалы и методы

Сбор растительного материала. В качестве исследуемых областей были выбраны горы в Челябинской области: г. Егоза (Е) и две вершины г. Золотой: высота со стелой (К1) и ближайшая к ЗАО «Карабашмедь» (К2). По неопубликованным данным М. Г. Малевой местообитания значительно отличались концентрациями Fe, Zn, Cd, Pb, Cu в почве.

Сбор листьев растений осуществляли в фазе вегетации равномерно по всей территории, при обнаружении естественных группировок растений отбирали один образец из группы. Материал транспортировали и хранили во влажной среде при пониженных температурах.

Выделение НК. Из промытых листьев брали высечки, которые взвешивали и использовали для выделения нуклеиновых кислот (НК) методом Porebski et al. [6] с модификациями. Количество и чистоту НК измеряли на микропланшетном ридере TECAN Infinite M200 PRO («Tecan Group Ltd.», Австрия) на планшете Nano Quant при длинах волн 310, 280 и 260 нм. Чистоту препарата оценивали по соотношению A_{260}/A_{280} [2]. Качественную проверку НК осуществляли с помощью горизонтального электрофореза в 0,8 % агарозном TBE геле с добавлением бромистого этидия.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для амплификации межмикросателлитных участков генома использовали праймеры UBC Primer Set: UBC811, UBC825, UBC827, UBC830 (ЗАО «Евроген», Россия). В реакционной смеси конечным объемом 20 мкл содержалась dH₂O, 1 mM dNTP, 0,5 mM праймера, 5xBuffer (MgCl₂ 2,5 mM), 0,1 ед./мкл HSTaq полимеразы и 60 нг образца.

Программа ПЦР состояла из предварительной денатурации 5 мин 95 °С, 40 циклов денатурации 40 с при 95 °С, отжига праймера 50 с при 46,1, 47,6 или 49,7 °С и элонгации 40 с при 72 °С, и финальной элонгации 10 мин при 72 °С. ПЦР осуществляли амплификаторе T100 ThermalCycler (Bio-RadLaboratories, США).

* Е. В. Жуйкова, И. С. Киселева, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина (Екатеринбург).

E-mail: elena.zhuykova@urfu.ru

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке постановление № 211 Правительства РФ, контракт № 02.А03.21.0006 и гранта РФФИ №15-04-08380 А.

Контроль результатов реакций производили с помощью электрофореза в 1,2 % агарозном TBE геле, окрашенном бромистым этидием. Гели визуализировали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, США).

Электрофореграммы обрабатывали вручную, на их основе составляли матрицы присутствия и отсутствия. Показатели на основе данных бинарных матриц рассчитывали в программах PAST 3.18 [1] и GenAlEx 6.503 [5].

Результаты и их обсуждение

Для оценки уровня генетического разнообразия локальных популяций был выбран метод Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), праймер в котором состоит из микосателлитной последовательности. Метод является более специализированным и стабильным вариантом Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), поэтому нуждается в предварительной стандартизации.

В ходе поиска праймеров с четким спектром максимального количества бэндов было проверено 22 праймера. В конечном итоге выбор был остановлен на 7 праймерах набора UBC, их оптимальные температуры отжига были установлены в предыдущих исследованиях.

Также была проведена работа по выбору рабочей концентрации НК на ПЦР. С выбранными праймерами тестировались концентрации 30, 50, 70 и 100 нг/мкл. Универсальной была признана концентрация в 30 нг/мкл при внесении в реакционную смесь 2 мкл НК. Из имеющихся семидесяти образцов *S. officinalis* были случайно отобраны 25 образцов с г. Золотой и 17 с г. Егозы, с которыми успешно проходила ПЦР. Таким образом, всего в исследовании участвовало 42 образца.

В ходе работы были отмечены праймеры, дающие большое количество бэндов. Например, спектр праймера UBC825 состоял из 44 полос. Это обстоятельство позволило набрать количество бэндов, обеспечивающее достоверность результатов (> 100), с помощью использования четырех праймеров.

Рассматриваемые праймеры имели различные качественные и количественные характеристики спектров. Так, среднее количество бэндов на праймер варьировало от 15 у UBC811 до 44 у UBC825 при среднем значении 25,5. Длины фрагментов также существенно отличались: ампликоны UBC811 располагались в промежутке от 300 п.н. до 1400 п.н., у UBC825 от 390 п.н. до 2500 п.н., у UBC827 от 390 п.н. до 2000 п.н., а у UBC830 от 390 п.н. до 1900 п.н.

Количество бэндов на образец в среднем составляло 48,5, с разбросом от 37 до 57. Обнаружено 6 уникальных ампликонов – идентифицированных только у одного образца.

На основе полученной бинарной матрицы был рассчитан ряд показателей, построены кластеризация по методу невзвешенного попарного среднего (рис. 1) и график, полученный в ходе многомерного масштабирования (рис. 2). Для всех построений использовалась метрика Жаккара.

Из полученных данных видно, что среднее количество бэндов на образец, эффективное число аллелей, количество полиморфных локусов, показатель генетического расстояния Нея и индекс разнообразия Шеннона находятся в прямой зависимости от суммарного индекса токсической нагрузки – интегрального показателя загрязнения среды тяжелыми металлами (таблица). Последние два показателя достоверно отличаются у субпопуляций г. Золотой и г. Егозы. Четкое разделение двух локальных популяций также хорошо заметно на кластерном анализе. Многомерное масштабирование показывает, что уровень изменчивости в обоих экотопах высок, однако разброс точек на г. Золотой значительно больше. Две выборки с вершин г. Золотой смешиваются, что говорит о существовании единой субпопуляции.

На генетическое разнообразие популяций, находящиеся в неблагоприятных условиях, поллютанты действуют двояко. С одной стороны, поллютанты способствуют повышению уровня мутагенной активности, с другой – исчезновению неприспособленных особей и, следовательно, сокращению численности. Ранее было показано, что для *S. officinalis* характерен интенсивный поток генов между пространственно разделенными группами особей, который компенсирует последствия генетического дрейфа и имбридинга, характерных для малых популяций [3; 4]. Разнообразие возрастает из-за роста числа мутаций и разбалансировке механизмов репарации, что отражается на всех уровнях. Все вышеперечисленное объясняет повышенные показатели генетического разнообразия в загрязненной зоне работы ЗАО «Карабашмедь». Вместе с тем обнаруженных отличий недостаточно, чтобы перевести субпопуляции в более крупный ранг.

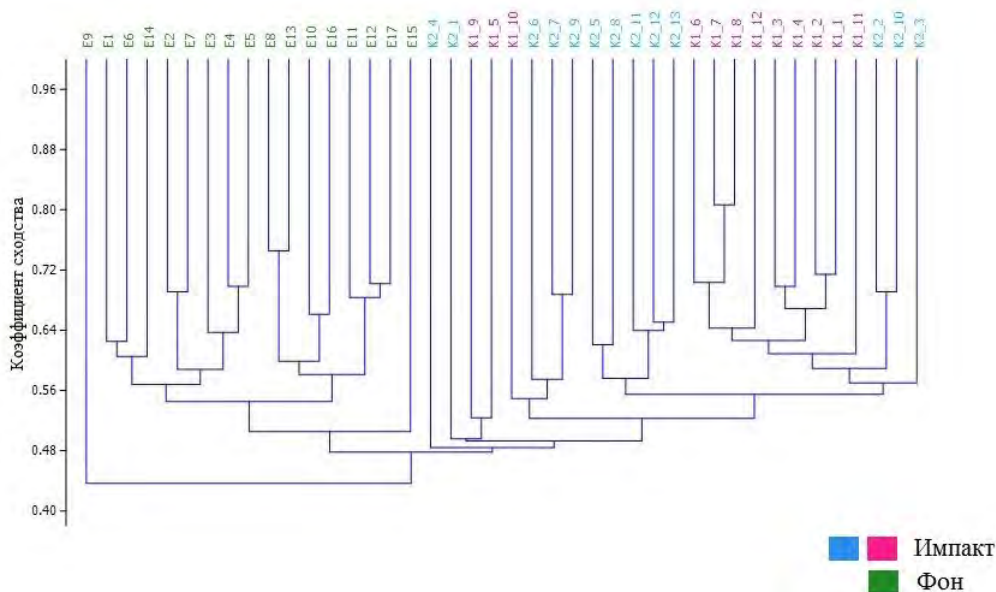


Рис 1. Иерархическая кластеризация ISSR-профилей образцов *S. officinalis*, построенная методом UPGMA с метрикой расстояний Жаккара. Образцы со склонов г. Золотой (г. Карабаш) обозначены розовым и голубым, с г. Егозы – зеленым

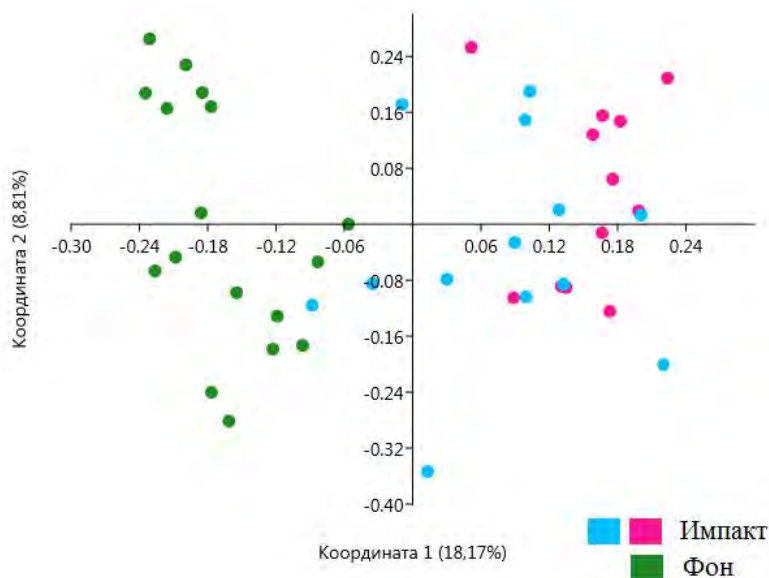


Рис. 2. Точечная диаграмма *S. officinalis*, построенная по результатам многомерного масштабирования с использованием метрики Жаккара. Образцы со склонов г. Золотой (г. Карабаш) обозначены розовым и голубым, с г. Егозы – зеленым

Некоторые показатели генетического разнообразия *S. officinalis*

Местообитание	г. Золотая	г. Егоза
Суммарный индекс токсической нагрузки	17	1
Количество образцов	25	17
Индекс клональности	0	0
Среднее количество бэндов на образец	48,96	47,82
Процент полиморфных локусов	91,18	73,53
Эффективное число аллелей	1,450 ± 0,030	1,400 ± 0,030
Генетическое разнообразие Нея (1973)	0,270 ± 0,017	0,239 ± 0,019
Индекс разнообразия Шеннона	0,413 ± 0,023	0,363 ± 0,026

Литература

1. Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – V. 4, № 1. – P. 1–9.
2. High throughput DNA quantification and quality checks for low volume samples. Technical Note. – Tecan Group Ltd, 2014. – 4 p.
3. Kutsev M. G., Sinitsyna T. A., Kondo K. Genetic diversity between three species of *Sanguisorba* L. from West Siberia based on Randomly Amplified DNA Fingerprints // *Biotechnology And Plant Genetics*. – 2013. – V. 16, № 2. – P. 134–137.
4. Martin M., Settele J., Durka W. Genetic population structure and reproductive fitness in the plant *Sanguisorba officinalis* in populations supporting colonies of an endangered *Maculinea* butterfly // *International Journal of Plant Sciences*. – 2008. – V. 169, № 2. – P. 253–262.
5. Peakall R., Smouse P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28, № 19. – P. 2537–2539.
6. Porebski S., Grant B., Boum B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1997. – V. 15, № 1. – P. 8–15.

E. V. Zhuikova, I. S. Kiseleva,
Ural Federal University (Ekaterinburg)

**GENETIC DIVERSITY OF *SANGUISORBA OFFICINALIS* L.
POPULATIONS FROM THE LOCALITIES
NEAR KARABASHSKIY COPPER-SMELTING PLANT**

The genetic diversity based on Inter-Simple-Sequence-Repeats loci analyses in two *Sanguisorba officinalis* L. populations from the surroundings of Karabashskiy Copper-Smelting Plant (impact) and background area of mountain Egoza was evaluated. The results show that in general, the diversity of the population from the contaminated habitat is higher than from the background one. It was found that Shannon's Information Index and the expected heterozygosity was significantly different in studied localities. The obtained data allow to suggest that studied local populations from the mountains Zolotaya (impact area) and Egoza (background area) are the part of the same *Sanguisorba officinalis* L. population.