

УДК 576.08+58.08

М.В. Скапцов, Д.Л. Белкин, А.А. Кечайкин, М.Г. Куцев, А.И. Шмаков

M.V. Skaptsov, D.L. Belkin, A.A. Kechaikin, M.G. Kutsev, A.I. Shmakov

ПОЛИМОРФИЗМ ГОРНЫХ И ГОРНО-РАВНИННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФЛОРЫ АГС И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ СОХРАНЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

POLYMORPHISM OF MOUNTAIN AND MOUNTAIN PLAIN POPULATIONS OF SOME SPECIES OF FLORA AMC AND PERSPECTIVES THEIR CONSERVATION *IN VITRO*

В результате работы исследовано генетическое разнообразие модельных видов основных семейств, произрастающих на территории АГС. Установлено значительное различие генетического разнообразия между популяциями, особенно в горных регионах. Для данных видов была произведена оценка цитотипических различий между популяциями. Данные фрагментарного анализа позволили выявить значительный полиморфизм популяций в таких родах, как *Potentilla*, *Rumex*, *Taraxacum* и в меньшей степени в родах *Veronica*, *Chenopodium*, *Woodsia* и *Polypodium*. Кроме того, представители родов *Inula* (*I. britannica*) и *Rumex* (*R. acetosa*) были введены в культуру клеток и тканей *in vitro*, для которых мы произвели предварительную оценку соматональной изменчивости на основе данных вариаций относительного содержания ДНК.

Введение

Сохранение биоразнообразия остается одной из главных проблем в современном мире. И одним из путей решения этой проблемы являются методы выявления биоразнообразия для сохранения не только отдельных таксономических единиц, но генетического разнообразия в целом. Кроме классических анатомо-морфологических методов в современной таксономии существуют методы анализа молекулярно-генетических, цитотипических, кариологических и многих других признаков для оценки различий между организмами, как внутри вида, так и в нетаксономических единицах рангом ниже вида. Кроме того оригинально применяемые методы молекулярно-генетического анализа вместе с биотехнологическими подходами позволяют создавать искусственные модели генетических изменений в культуре *in vitro*. Данные модели визуализируют некоторые природные явления, например, в условиях высокогорья различие генетического разнообразия в популяциях является значительным (зоны видообразования) (Hendry, Day, 2005; Parisod, Christin, 2007; Wendy, Sork, 2001), а также помогают сделать предположения о возможной скорости эволюции и подверженности генетическим изменениям под действием мутагенных факторов. Похожие данные были получены многими исследователями популяций высокогорных и равнинных территорий (Joost et al., 2007; Manel et al., 2003; Wondimu et al., 2014). Таким образом, высокое присутствие мутагенных факторов влияющих на скорость эволюции вызывает увеличение уровня полиморфизма генов между популяциями одного вида, что соответственно влияет на генетические дистанции между ними. В будущем это может привести к появлению новых таксономических единиц.

Материалы и методика

В качестве основы молекулярно-генетического анализа использовали фрагментарный анализ ДНК RAF (Randomly Amplified DNA Fingerprints). RAF – один из наиболее эффективных методов для исследования эволюции генетического разнообразия и межпопуляционных взаимоотношений животных и растений (Waldron et al., 2002). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали экстрагированную ДНК из высушенных гербарных образцов исследуемых видов растений.

ДНК изолировали, используя СТАБ-метод (Doyle, Doyle, 1987). Для работы использовали олигонуклеотиды серии RAF. Для ПЦР реакции использовали 25 мкл реакционной смеси, содержащую 5 нг ДНК, 2,5 мкл 10x ПЦР буфера, 25 mM MgCl₂, 1 мкл 5mM смеси dNTPs, 1 мкл каждого 10mM праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. ПЦР проводили используя RAF протокол: 94,0°C – 5 мин. [94,0°C – 30 сек., 57,0°C – 1 мин., 56,0°C – 1 мин., 55,0°C – 1 мин., 54,0°C – 1 мин., 53,0°C – 1 мин.]x35, 72,0°C – 10 мин., 4,0°C в конце процесса. Фрагменты ДНК разделяли при помощи автоматической электрофорезной станции Bio-Rad Experion.

При анализе были сформированы матрицы на основе присутствия (1) или отсутствия (0) фрагментов равной длины (Куцев, 2009). Среднее количество фрагментов составляло 60. Этот набор данных был использован для расчета генетических оценки разнообразия, полиморфизма, индекса Шеннона между популяциями, используя ПО GeneALEx 6.5.

Для исследования размера геномных изменений использовали гербарный материал и живые молодые листья растений. Содержание ДНК в ядрах измеряли при помощи метода проточной цитометрии. Детекция изменений в размере генома растений, произрастающих на разных территориях, одних и тех же или близких видов позволяет судить о ходе эволюционных процессов, их типе или прогнозировать последующие шаги эволюции. Данный метод активно используется зарубежными учеными и отсутствует в практике российских ученых. Нами были разработаны методы выделения ДНК и постановки эксперимента сложных для проведения анализа образцов. Кроме того, разработка внешних стандартов позволила самостоятельно исследовать геном растений от 0,5 до 150 пг. Основным методом для анализа содержания ДНК являлась проточная цитометрия с окраской изолированных ядер пропидий иодидом (PI). Использование метода окраски с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) было не целесообразно, т.к. краситель в основном окрашивает АТ обогащенные участки ДНК, тогда как процентное содержание АТ в ДНК различных групп растений и животных значительно отличается, вследствие чего возможно появление неточности расчетов. Молодые листья или высушенный гербарный материал измельчали при помощи лезвия в 500 мкл охлажденного буфера Otto I с модификациями (0,1 М лимонной кислоты, 0,5% Triton) и инкубировали 10 мин. при комнатной температуре. Образцы фильтровали через нейлоновую мембрану с размером пор 50 мкм и смешивали с раствором для окрашивания, состоящим из 1 мл Tris-MgCl₂ буфера (0,4 М Tris-основание, 4 мМ MgCl₂·x6H₂O) с PI (50 мкг/мл), РНазы (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанол (1 мкл/мл). Исследование каждого образца проводили в два этапа. На первом этапе подбирали параметры детекции флуоресценции и выявления положения пика стандарта на графике, и отмечали канал флуоресценции стандарта. На втором этапе раствор стандарта добавляли к исследуемому образцу и проводили уже полноценное исследование. Для дальнейшей интерпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц (Скапцов и др., 2014).

В качестве внешнего стандарта использовали изолированные ядра *Pisum sativum* L. сорта Адагумский и *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A. W. Hill сорта Листовой с известным содержанием ДНК 2С = 8,0 пг и 4,69 пг соответственно.

Данные флуоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм. Сигналы записывались в логарифмическом представлении данных флуоресценции (логарифмическая шкала). Измерения производили не менее трех раз с периодичностью одно измерение в сутки для каждого образца. Для дальнейших расчетов использовали данные, не превышающие среднего значения содержания ДНК образца более чем на 3%.

Для трансформации данных из логарифмического в линейное представление использовали формулу: $f = 10^{X/64}$ (Marie, Brown, 1993). Содержание ДНК рассчитывали исходя из формулы $2C = f \cdot M$, где f – индекс (разница между средними значениями пика образца и стандарта в линейной шкале); X – разница между средними значениями пиков (каналов) стандарта и образца в логарифмической шкале; 64 – частное между количеством каналов шкалы прибора на количество декад на полной логарифмической шкале (256/4 для Partec CyFlow PA); M – среднее значение пика образца. Полученные результаты обрабатывали при помощи ПО Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) и штатного ПО проточного цитометра CyView (Partec, GmbH).

Материал для исследования соматоклональной изменчивости получали путем культивирования листовых эксплантов на основе среды Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 3 % сахарозы, 0,3 % фитагеля и регуляторов роста растений в концентрации α-нафтилуксусной кислоты (2 мг/л) и бензиладенина-6 (1 мг/л). Культуры помещали в условия постоянного фотопериода 8 часов день, 16 часов ночь и постоянной температуры 25 °С.

Пролиферирующие каллусы культивировали в течение 3 месяцев и перемещали на среду для регенерации (МС с 0,5 мг/л бензиладенина-6 и 0,2 мг/л гибберелловой кислоты). Культивирование производили до появления побегов. Побеги (3–4 см) срезали и переносили на среду для ризогенеза (1/2МС, 0,2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты) и культивировали до появления ризогенеза. Полученные регенеранты переносили в песчанно-торфяную смесь и использовали для дальнейшего анализа (Бутенко, 1999; Скапцов и др., 2014).

Результаты и обсуждение

Наибольшее количество признаков (бэндов, до 20–25) на электрофореграмме наблюдалось при использовании олигонуклеотидов RAF К-02а 5'-GTCTCCGCAC-3' и RAF К-02б 5'-GTCTCCGCAG-3'. Согласно данным фрагментарного анализа RAF были выявлены значительные отличия в полиморфизме популяций таких видов как *Potentilla shmakovii* Kechaikin, *P. chamaeleo* Sojak, *Taraxacum glabrum* DC., *Veronica linariifolia* Pall. ex Link, *Rumex acetosa* L., *Inula britannica* L., т. к. возрастание индекса Шеннона указывает на возрастание неопределенности и неоднородности структуры популяций (табл. 1). Значительная разница в генетическом разнообразии популяций в различных местообитаниях позволяет предположить возможность развития новых таксономических единиц рангом ниже вида. Зачастую важным моментом с точки зрения эволюции различных групп растений является изменение размера генома. Кроме того, такой показатель, как изменчивость цитотипов, может характеризовать генетические процессы, так же как фрагментарный анализ ДНК. Для подтверждения данной теории для цитофлюориметрического анализа использовали следующие виды: *Potentilla chamaeleo*, *Veronica linariifolia*, *Woodsia asiatica*, *Rumex acetosa*. В результате анализа были установлены значительные различия в размере генома всех используемых видов в различных популяциях. Так, размер генома (2С) *Potentilla chamaeleo* варьировал между популяциями в диапазоне 9 %, что значительно выше уровня коэффициента вариации стандартного эксперимента цитофлюориметрии, составляющего 3 %. Средний размер генома *Veronica linariifolia* варьировал в зависимости от популяции на 13 %, *Woodsia asiatica* отличался различиями в структуре цитотипов на 8 %, тогда как размер генома *Rumex acetosa* не отличался значительными различиями цитотипов в популяциях. Исходя из представленных данных, наибольшим количеством цитотипов представлен *Potentilla chamaeleo*. Наиболее высокий полиморфизм локусов представлен у популяций, произрастающих в высотных местообитаниях, для которых характерно высокое присутствие мутагенных факторов. Для оценки влияния соматоклональной изменчивости на геном растений нами были введены в культуру *in vitro* два вида в качестве модельных объектов: *Rumex acetosa* и *Inula britannica*. Культивирование осуществляли в течение 3-х месяцев в стадии каллусной культуры. Полученные регенеранты анализировали с помощью метода проточной цитометрии, также исследовали хромосомный состав регенерантов. Для регенерантов *Inula britannica*, как и *Rumex acetosa* не были характерны анатомо-морфологические изменения. Изменений в хромосомном составе *Inula britannica* также не наблюдалось, $2n = 16$ (рис. 3). Данные цитофлюориметрии соответствовали размеру генома экспланта с незначительными вариациями при определенном размере генома $2C = 3,54$ пг. Напротив, для *Rumex acetosa* уровень генетических изменений был значительно выше. Геномные изменения в каллусных культурах носили случайный характер и в большинстве случаев варьировали от 4,23 пг до 17,09 пг. Размер геномных изменений особей, регенерировавших из каллусов 3-х месяцев культивирования, являлся незначительным и уменьшился на 14 % ($2C = 7,18$ пг). Так как количество хромосом осталось без изменений, можно сделать предположение о преобладании таких мутаций, как делеции. Регенеранты, дифференцировавшиеся после 6 месяцев культивирования, только лишь накапливали подобные утраты. Зачастую присутствовали анеуплоидии, как в меньшую, так и в большую сторону. В связи с различным поведением генома клеток в культуре *in vitro* данных модельных объектов, можно предполагать о различном проявлении соматоклональной изменчивости и в других группах растений. Кроме того, культура клеток осуществлялась в течение короткого периода времени, в связи с этим существует вероятность и различной степени накопления мутаций, как генных, так и хромосомных.

Таблица 1

Анализ генетического разнообразия на основе вычислений частоты полиморфных локусов и индекса видового разнообразия Шеннона

Вид	Место произрастания популяции	Уровень полиморфизма локусов популяций, %	Индекс Шеннона	Среднее отклонение
<i>Potentilla shmakovii</i> Kechaikin	Монголия, хр. Каралахту, пер. Обатын Доба	33,33	0,202	0,056
	Монголия хр. Байтаг-Богда, г. Алтан-Обо	48,15	0,291	0,059

Окончание таблицы 1

Вид	Место произрастания популяции	Уровень полиморфизма локусов популяций, %	Индекс Шеннона	Среднее отклонение
<i>Potentilla chamaeleo</i> Sojak	Монголия, хр. Каралахту, пер. Обатын Доба	52,78	0,319	0,051
	Монголия хр. Байтаг-Богда, г. Алтан-Обо	33,33	0,202	0,048
	Монголия хр. Дзун-Джаргалант, дол. р. Ар-Шаатын-Гол	44,44	0,269	0,051
<i>Potentilla pamarica</i> Th. Wolf	Монголия, хр. Каралахту, пер. Обатын Доба	26,92	0,158	0,055
	Монголия хр. Байтаг-Богда, г. Алтан-Обо	30,77	0,198	0,061
<i>Taraxacum glabrum</i> DC	Россия, Респ. Алтай, плато Уюк	16,67	0,101	0,068
	Россия, Алтайский край, верховья р. 1ая Шумишка	8,33	0,057	0,057
<i>Taraxacum bessarabicum</i> (Hornem.) Hand.-Mazz.	Россия, Алтайский край, Аллейский р-он, степь	7,69	0,047	0,047
	Россия, Респ. Алтай, долина р. Чуя, г. Ржанная	46,15	0,279	0,087
<i>Veronica linariifolia</i> Pall. ex Link	Россия, Алтайский край, Смоленский р-он, среднее течение р. Песчаная	20,00	0,117	0,049
	Россия, Иркутская обл., побережье оз. Байкал, м. Киркирей	37,05	0,215	0,061
<i>Rumex acetosa</i> L.	Россия, Алтайский край, Смоленский р-он, низовья р. Песчаная	75,70	0,344	0,024
	Россия, г. Барнаул, долина р. Обь	47,70	0,215	0,031
<i>Inula britannica</i> L.	Россия, Респ. Алтай, с. Акташ, долина р. Чуя	66,67	0,399	0,073
	Россия, Респ. Алтай, пос. Манжерок, долина р. Катунь	55,56	0,314	0,07
<i>Woodsia alpina</i> (Bolton) Gray	Россия, г. Курган, урочище Иванов камень	11,11	0,067	0,067
	Китай, г. Сонг Шу Гоу, деградирующий листовенный лес	22,22	0,134	0,089
<i>Woodsia asiatica</i> Schmakov et Kiselev	Китай, г. Сонг Шу Гоу, деградирующий листовенный лес	55,56	0,336	0,106
	Россия, Чарышский р-он, сев. макросклон г. Каменная	22,22	0,134	0,089
<i>Woodsia calcarea</i> (Fomin) Schmakov	Россия, респ. Алтай, верховья р. Аккол	55,56	0,336	0,106
	Россия, Змеиногорский р-он, зап. берег оз. Кольванское	44,44	0,269	0,106
<i>Allium nutans</i> L.	Россия, Алтайский край, Змеиногорский р-он, западный склон Тигерекского хребта	35,77	0,207	0,048
	Россия, Респ. Алтай, Кош-Агачский р-он, на слиянии рек Чаган-Узун и Чуя	51,07	0,302	0,060

Заключение

Частое присутствие мутагенных факторов, влияющих на скорость эволюции, вызывает увеличение уровня полиморфизма генов между популяциями одного вида, что соответственно влияет на генетические дистанции между ними. Это в будущем может привести к появлению новых таксономических единиц. При распространении таких видов на территории с меньшим влиянием мутагенных процессов полиморфизм между популяциями восстанавливается, и снижается уровень эволюционных процессов. Ставится под сомнение сохранение редких и исчезающих растений с помощью методов биотехнологии, широко используемых при реализации программ по сохранению биоразнообразия и генетических ресурсов, так как отсут-

ствуется универсальный подход по культивации растений *in vitro*, из-за возможных генетических перестроек, кардинально меняющих структуру генома и отражающихся на анатомо-морфологических признаках (Reed et al., 2011.). Как правило, используются классические методы введения растений в культуру клеток и тканей *in vitro* с использованием стандартизированных питательных сред и регуляторов роста, которые в процессе пролиферации каллусной ткани могут вызывать генные и геномные мутации. Между тем, подобные методы широко используются как в промышленности, так и в лабораториях по всему миру без анализа генетических изменений (Sharma et al., 2010.).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований проект № 14-04-31156 и Российского научного фонда.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Куцев М.Г.** Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. – Барнаул: Арктика, 2009. – 163 с.
- Скапцов М.В., Балабова Д.В., Куцев М.Г.** Оптимизация сред для культивирования растений *in vitro* на примере щавеля водного (*Rumex aquaticus* L.) // Сельскохозяйственная биология растений, 2014. – № 1. – С. 32–35.
- Скапцов М.В., Смирнов С.В., Куцев М.Г.** Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии // Turczaninowia, 2014. – Т.17, № 3. – С. 72–78.
- Doyle J.J., Doyle J.L.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull., 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
- Gram W.K., Sork V.L.** Association between environmental and genetic heterogeneity in forest tree populations // Ecology, 2001. – Vol. 82. – P. 2012–2021.
- Hendry A.P., Day T.** Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time // Molecular Ecology, 2005. – Vol. 14. – P. 901–916.
- Joost S., Bonin A., Bruford M.W., Despres L., Conord C., Erhardt G.** A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation // Molecular Ecology, 2007. – Vol. 16. – P. 3955–3969.
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P.** Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics // Trends in Ecology and Evolution, 2003. – Vol. 18. – P. 189–197.
- Marie D., Brown S.C.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species // Biol Cell, 1993. – Vol. 78. – P. 41–51.
- Parisod C., Christin P.** Genome-wide association to fine-scale ecological heterogeneity within a continuous population of *Biscutella laevigata* (Brassicaceae) // New Phytologist, 2007. – Vol. 178, No. 2. – P. 436–447.
- Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V.** Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 2011. – Vol. 47. – P. 1–4.
- Sharma M.M., Ali D.J. and Batra A. Plant regeneration through *in vitro* somatic embryogenesis in ashwagandha (*Withania somnifera* L. Dunal) // Researcher, 2010. – Vol. 2, No. 3. – P. 1–6.
- Waldron J., Peace C.P., Searle I.R., Furtado A., Wade N., Findlay I., Gaham M.W., Carroll B.J.** Randomly Amplified DNA Fingerprinting: a culmination of DNA marker technologies based on arbitrarily-primed PCR amplification // Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2002. – Vol. 3. – P. 141–150.
- Wondimu T., Gizaw A., Tusiime F.M., Masao C.A., Abdi A.A., Gussarova G., Popp M., Nemomissa S., Brochmann C.** Crossing barriers in an extremely fragmented system: two case studies in the afro-alpine sky island flora // Plant Syst Evol, 2014. – Vol. 300. – P. 415–430.

SUMMARY

As a result genetic model species diversity of major families growing in the Altai mountain country (AMC) was studied. A significant difference in genetic diversity between populations, especially growing in mountainous regions has been shown. For these species cytotype differences between populations have been evaluated. Fragmentary data analysis revealed a significant polymorphism in populations of such genera as *Potentilla*, *Rumex*, *Taraxacum* and lesser extent in genera *Veronica*, *Chenopodium*, *Woodsia* and *Polypodium*. In addition, representatives of the genera *Inula* (*I. britannica*) and *Rumex* (*R. acetosa*) were introduced into the culture of cells and tissues *in vitro*, to make a preliminary assessment of somaclonal variation on the basis of variations in the relative content of DNA.