

УДК 577.1.582

03.12.2010 г.

Е.Е.АШИРБЕКОВ¹, А.С.ЧЕРУШЕВА, М.А.МЕНДЕШ¹,
Т.С.БАЛМУХАНОВ¹, Г.М.КУДАБАЕВА², Р.О.ЗАКИРОВА², Н.А.АЙТХОЖИНА¹

RAPD-АНАЛИЗ ДНК *POLYPODIUM VULGARE*

Проведено молекулярно-генетическое исследование пяти популяций лекарственного растения *Polyodium vulgare*, собранных в подгорных равнинах Заилийского Алатау. Методом RAPD определена средняя внутривидовая изменчивость исследованной группы, уровень полиморфизма в которой составил 69,11%. Коэффициент подразделенности популяций указывает, что на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия *P. vulgare* приходится 60,51%.

Введение. *Polyodium vulgare* является типичным представителем рода, насчитывающего около 100 видов истинных папоротников. Растение предпочитает влажные, затененные участки земли, однако способно к существованию на каменистых и песчаных почвах [1, 2]. На протяжении 2000 лет они использовались в медицине в качестве антипаразитарного и отхаркивающего средства. *P. vulgare* имеет как практическое значение, связанное с тем, что этот представитель флоры относится к лекарственным растениям, так и теоретическое общенациональное значение, обусловленное тем, что *P. vulgare* относится к реликтовым видам растений. Реликтовые виды растений в современных климатических условиях, как правило, имеют небольшую численность и сильно фрагментированные ареалы. Состояние популяций таких видов часто ухудшается под влиянием антропогенного воздействия, что приводит к дальнейшему сокращению размеров популяций. Как следствие, наблюдается снижение генетического разнообразия и усиление негативных последствий генетического дрейфа и инбридинга, что может привести к полному исчезновению вида. Для более детальной характеристики популяций этого растения необходимо проведение современных популяционно-генетических исследований. Такие исследования позволяют оценить уровень генетического разнообразия, который является основой устойчивости и селекционного потенциала популяций.

Наибольшее распространение среди методов, позволяющих решать задачи, связанные с выявлением генетического полиморфизма и филогенетических взаимоотношений среди растений, получили методы основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). К таковым, в частности, относится использованный в работе метод

RAPD (random amplified polymorphic DNA), основанный на использовании ПЦР с одиночными десятичленными праймерами с преобладающим G/C-составом и низкими температурами отжига [3, 4]. Образцы электрофоретического разделения амплифицированной ДНК из различных генетических источников могут быть объектом сравнительного анализа, на основании которого определяется уровень генетического сходства.

Материалы и методы. В работу включены образцы растений из 5 популяций, собранных в подгорных равнинах Заилийского Алатау. Для исследования генетической изменчивости с каждой популяции были случайным образом собраны по десять растений.

Для RAPD-ПЦР использовали 20 праймеров: OPA-01, OPA-02, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPA-17, OPA-19, OPA-20, OPB-03, OPB-07, OPD-20, OPF-01, OPF-10, OPH-08, OPW-04, OPW-08, OPY-11, OPY-13. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала ~10 нг ДНК, 3 mM Mg Cl₂, 6 пМ праймера, смесь dNTP по 200 мкМ каждого и 1 ед. Таq-ДНК-полимеразы (Сибэнзим) в рекомендованном производителем буфере. Амплификацию проводили в следующем режиме: первая денатурация 95°C 3 мин, затем 40 циклов амплификации (94°C – 30 с, 37°C - 30 с, 72°C - 40 с).

Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 8 % акриламидном геле. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали водой, просматривали в ультрафиолетовом свете и фиксировали в цифровом формате с помощью гель-документирующей системы фирмы BioRad. Первичная обработка и сравнительный анализ полученных паттернов, а также определение длин фрагментов проводилось с использованием программного обеспечения «Quantity One».

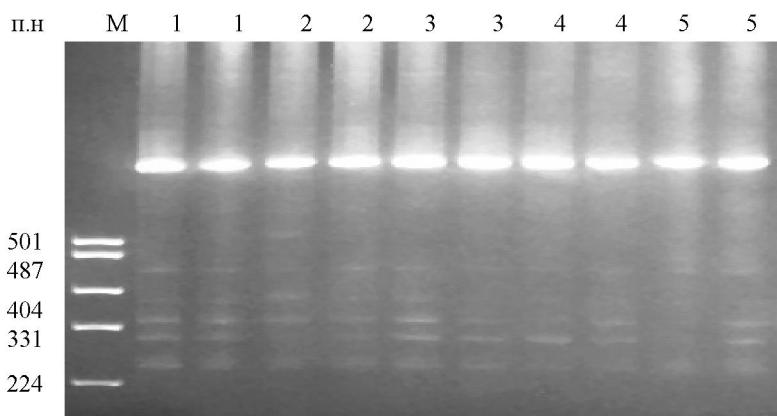


Рис. 1. RAPD-спектры пяти популяций *P. vulgare* с праймером ОРА-10: М – маркер молекулярной массы, номера дорожек соответствуют популяциям.

Для оценки степени полиморфизма и уровня дивергенции между изученными штаммами полученные данные представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось соответственно как состояние «1» или «0». Различия интенсивности полос в расчет не принимались. По матрице бинарных признаков были рассчитаны матрицы различий и построены дендрограммы сходства невзвешенным парно-групповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA). Расчет генетической дистанции проводился по формуле:

$$GD_{XY} = 1 - \frac{2N_{XY}}{N_X + N_Y}$$

где GD_{XY} – генетическое расстояние по Nei и Li [6], N_X – число фрагментов в спектре X, N_Y – число фрагментов в спектре Y, N_{XY} – число общих фрагментов.

Определение частот встречаемости локусов и расчет внутривидового и внутрипопуляционного полиморфизма был выполнен с применением программы Popgene [7].

Результаты и обсуждение. Использование RAPD-праймеров ОРА-01, ОРА-02, ОРА-09 и ОРА-13 либо не приводило к синтезу амплифицированных фрагментов ДНК, либо данные фрагменты синтезировались в низких количествах, в связи с чем были исключены из дальнейшего анализа.

Оставшиеся праймеры могут быть условно разделены на две группы: мономорфные и поли-

морфные. Амплификация с использованием мономорфных праймеров приводит к синтезу фрагмента или набора фрагментов одинаковой молекулярной массы, характерной для изучаемого вида и присутствующие в паттернах всех исследованных образцов (рис.1). Использование полиморфных праймеров выявляет полиморфизм внутри группы.

Характерной особенностью для *P. vulgare* является наличие в паттернах относительно небольшого числа фрагментов, а для трех праймеров (из 16 активных) синтезировался лишь один фрагмент. Таким образом, общее число выявленных локусов равнялось 123, что в среднем составляет 7,7 локуса на праймер.

Из выявленных 123 локусов в суммарной выборке 85 являлись полиморфными, уровень полиморфизма составил 69,11%. Число амплифицированных фрагментов, в зависимости от используемого праймера, варьирует от 1 (OPA-10, OPF-10, OPY-11) до 18 (OPB-03). Синтез с праймером OPB-03 демонстрирует наиболее высокий уровень полиморфизма (89%). Число полиморфных фрагментов в суммарной выборке в зависимости от используемого праймера колеблется от 0 до 16 (уровень полиморфизма варьировал от 0 до 89%). В популяциях 1 и 4 зарегистрирован самый низкий (9,8%) и самый высокий уровень полиморфизма (27,6%) соответственно.

Показатели генетического разнообразия в популяциях *P. vulgare*, полученные при использовании метода RAPD, представлены в таблице 1.

Эффективное число аллелей (n_e) для суммарной выборки *P. vulgare* оказалось равным 1,36,

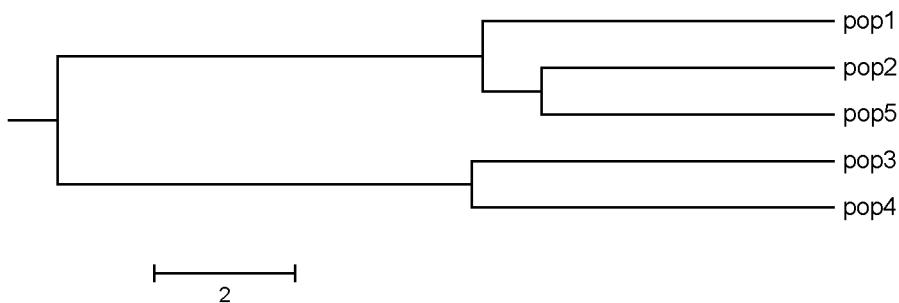


Рис. 2. Дедрограмма родственных взаимоотношений, полученная на основе RAPD-анализа пяти популяций *P. vulgare*

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия в популяциях *P. vulgare*, полученные при использовании RAPD-метода

	Популяция					Суммарная выборка
	1	2	3	4	5	
n	85	80	82	100	94	123
P	12 (0,1412)	15 (0,1875)	24 (0,2926)	34 (0,3400)	32 (0,3404)	85 (0,6911)
n_a	1,0976 (0,2979)	1,1220 (0,3286)	1,1951 (0,3979)	1,2764 (0,4491)	1,2602 (0,4405)	1,6911 (0,4639)
n_e	1,0780 (0,2383)	1,0976 (0,2629)	1,1561 (0,3183)	1,2211 (0,3592)	1,2081 (0,3524)	1,3589 (0,3398)
H_o	0,0621	0,0776	0,1242	0,1759	0,1656	0,3388
H_{pop}			0,1211			
H_{pop}/H_{sp}			0,3574			
$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$			0,6426			

Примечание: Р – число полиморфных фрагментов (доля полиморфных фрагментов); n_a – абсолютное число аллелей на локус (станд. откл.); n_e – эффективное число аллелей на локус (станд. откл.); H_o – индекс разнообразия Шеннона для популяции; H_{pop} – среднее значение индекса Шеннона для популяций; H_{pop}/H_{sp} – внутрипопуляционное разнообразие; $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ – межпопуляционное разнообразие.

тогда как абсолютное число аллелей на локус (n_a) составило 1,69. Общее генное разнообразие в суммарной выборке (H_o), представляющее собой гетерозиготность на всю выборку, составило 0,2203. Среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам среди популяций (H_s), являющееся средней гетерозиготностью, составило 0,0870. Таким образом, средняя гетерозиготность среди популяций оказалась гораздо ниже, чем в общей выборке. Коэффициент подразделенности популяций (G_{st}) показал, что на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия *P. vulgare* приходится 60,51%.

Оценка внутри- и межпопуляционного разнообразия рассчитана также на основе информационного индекса Шеннона. Индекс Шеннона для общей выборки составил 0,3388, в то время как

среднее значение этого индекса среди популяций оказалось равным 0,1211. Доля внутрипопуляционного генетического разнообразия, рассчитываемое как отношение значения индекса Шеннона в среднем в популяциях на значение этого же индекса в суммарной выборке, составило 35,74%. Соответственно, на долю межпопуляционного разнообразия пришлось 64,26%. Значения долей генетического разнообразия, рассчитанные двумя методами, различаются на 3,75%.

На основе объединенных данных, полученных при анализе RAPD-спектров, построена дендрограмма родственных взаимоотношений пяти изученных популяций *P. vulgare* (рис.2).

Дендрограмма состоит из двух кластеров: в первый кластер вошли популяции 1, 2 и 5, во второй кластер объединил популяции 3 и 4. Высокий

уровень полиморфизма, полученный для суммарной выборки, в основном явился следствием различий между популяциями этих двух кластеров.

Проведенные исследования указывают на неоднородность генофондов популяций *P. vulgare*. Полученные данные могут быть полезными при разработке мероприятий по охране этого реликтового вида растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haufler C.H., Windham M.D., Lang F.A., Whitmore S.A. Polypodium Linnaeus // Flora of North America North of Mexico. 1993. V.2. P.315-323.
2. Royal Botanic Garden Edinburgh (RBGE): Digital Flora Europaea: Polypodium species list. 2007.
3. Henry R.J. Plant genotyping: the DNA fingerprinting of Plants // Southern Cross University, Australi. 2001. 324 p.
4. Areskeviciute J., Paulauskas A., Cesoniene L., Daubaras R. Genetic characterisation of wild cranberry (*Vaccinium oxycoccus*) from Cepkeliai reserve by the RAPD method // Biologija. 2006. V.1. P.5-7.
5. 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.
6. <http://www.ualberta.ca/~fyeih/index.htm>

Резюме

Генетикалық түрлілігін бағалау мақсатында *P. vulgare* дәрілік өсімдігінің популяциялық-генетикалық зерттеуді жүргізілді. Іле Алатау жотасында жиналған бес популяциясының өсімдіктерінен сыйнамалар зерттелді. RAPD әдісімен зерттелген тоptyң орташа түрлілік өзгеріштігі анықталды, полиморфизм деңгейі 69,11% құрды. Популяцияның айырмашылық коэффициенті *P. vulgare* генетикалық түрлілігінің популяцияаралық компонентіне 60,51% келетінін көрсетті.

Summary

A population-genetic study of medicinal plants *P. vulgare* was performed to assess genetic diversity. Samples from five populations were collected in the piedmont plains of Trans-Ili Alatau. The RAPD-method allows to reveal mean intraspecific variation in the studied group, the level of polymorphism was 69,11%. The populations' coefficient of subdivision showed that the *P. vulgare* interpopulation component of genetic diversity has 60.51%.

Институт молекулярной биологии и
биохимии им. М.А. Айтхожина
г. Алматы;

Институт ботаники и фитоинтродукции,
г. Алматы

Поступила 15.12.2010 г.