

© С. В. Боронникова¹,
С. А. Мандрица¹,
Т. Н. Светлакова¹,
А. В. Назаров², А. В. Суслонов³

¹ ГОУ ВПО «Пермский
государственный университет»
Биологический факультет;

² Институт экологии и генетики
микроорганизмов Уро РАН;

³ Государственная инспекция по
экологии и природопользованию
Пермского края.

✿ Методом ПЦР-реакции с ISSR
праймерами получены показатели
уровня генетического разнообразия
Poa pratensis L, произрастающего
на экспериментальных
нефтезагрязненных площадках.
На основе этих показателей
подтверждено, что растения,
произрастающие в условиях
нефтяного загрязнения почв,
характеризуются пониженным
уровнем генетического разнообразия.

✿ **Ключевые слова:** уровень
генетического разнообразия;
нефтяное загрязнение почв; *Poa
pratensis* L.; полиморфизм ДНК-
маркеров; ISSR-метод.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МАРКЕРОВ НА ПРИМЕРЕ *POA PRATENSIS* L.

Влияние нефтяного загрязнения на функционирование живых систем является актуальной темой вот уже несколько десятилетий. Нередкие аварийные ситуации или зоны с нефтепромышленными комплексами неуклонно предоставляют исследователям возможность наблюдать отрицательное влияние нефтяного загрязнения на состояние природных сообществ (Шилова, 1977; Максименко, 1997; Железнова, 2005).

Нефть, попадая в почву, оказывает на растения длительное негативное влияние, достигающее в случае сильного загрязнения 10 лет и более (Шилова, 1997; Максименко и др., 1997). Нефть оказывает на растения токсическое действие, кроме того, нефтяное загрязнение воздействует на них через трансформацию физико-химических свойств почвы (Гузев и др., 1989; Хазиев и др., 1984). Сведения о влиянии нефти на генетику растений крайне немногочисленны и касаются воздействия «свежезагрязненной» почвы (Семериков, 1990; Аниськина, 2006; Pena-Castro et al., 2006).

В Добрянском районе Пермского края на опытном стационаре, в дерново-подзолистой почве злаково-разнотравного лугового биоценоза, сотрудники Пермского Института экологии и генетики микроорганизмов заложили экспериментальные площадки. На этих площадках проводилось изучение естественного формирования растительного покрова (Назаров, 2000). По результатам их исследований к группе наименее угнетаемых многолетних видов растений при естественном зарастании можно отнести *Poa pratensis* L.

На этих же экспериментальных площадках проводились исследования структуры и разнообразия микробных сообществ. В опубликованных работах (Назаров, 2005, 2006) описано изменение качественного и количественного состава микроорганизмов, влекущее за собой изменения в микробно-растительных взаимодействиях. Разработаны рекомендации по биорекультивации нефтезагрязненных почв.

P. pratensis характеризуется как устойчивый к механическим повреждениям почвы, сопровождающим разработку месторождений и планирование буровых установок (Шуйцев, 1982), с ростом концентрации нефтепродуктов в почве *P. pratensis*, как и другие злаки, увеличивает свою долю в общем почвенном покрове.

Одним из широко распространенных методов молекулярной генетики, позволяющим оценивать уровень генетического разнообразия, является метод ISSR-ПЦР. В этом методе в качестве ПЦР-праймеров используют ди- и тринуклеотидные микросателлитные повторы с произвольными нуклеотидами на 3'-конце. Этот метод характеризуется высокой надежностью и воспроизводимостью, что позволяет его использование в фундаментальных и прикладных исследованиях (Соболев, 2006).

Поступила в редакцию 23.11.2009
Принята к публикации 21.12.2009

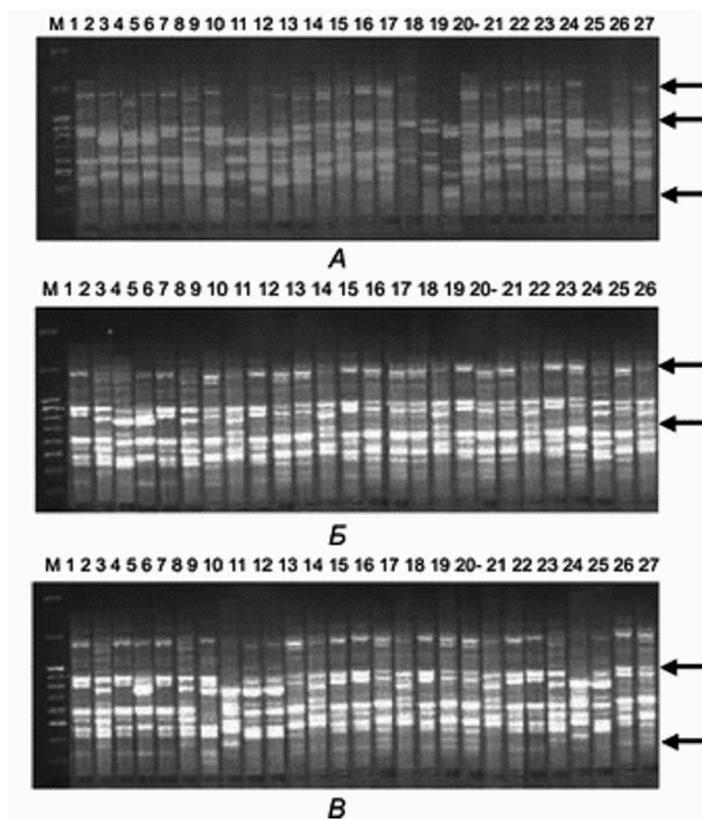


Рис. 1. ISSR-спектры особей *Poa pratensis* L. с праймером М1, произрастающих на контрольных площадках (А), произрастающих на экспериментальных площадках 1999 года загрязнения (Б), произрастающих на экспериментальных площадках 1996 года загрязнения (В).

Цифрами обозначены номера проб, М — маркер молекулярного веса. Стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в 2008 году на опытном стационаре Института экологии и генетики микроорганизмов на экспериментальных нефтезагрязненных площадках. Доза внесенной нефти составляла 24 л/м². Случайным образом были избраны по 10 экспериментальных площадок давности загрязнения 9 и 12 лет (площадки 1999 и 1996 годов загрязнения) и 10 контрольных площадок, расположенных на этом же лугу, что в совокупности составило 30 площадок.

Объектом исследований был выбран представитель семейства злаков *P. pratensis*, который был широко представлен на территории исследования. Для проведения молекулярно-генетического анализа растений при нефтяном загрязнении была выделена ДНК из листьев 90 особей: 30 образцов с площадок 12-летней давностью загрязнения, 30 образцов — с 9-летней и 30 контрольных образцов с незагрязненных площадок. ДНК выделяли из свежесобранных листьев — по 100 мг с растения, с использованием методики А. М. Torges et al. (1993) с незначительными модификациями. Для поли-

меразной цепной реакции использовалась реакционная смесь объемом 25 мкл следующего содержания: 2 единицы Taq-полимеразы («Силекс М»), 2,5 мкл стандартного 10× буфера для ПЦР (Силекс М), 25 пМ праймера, 2,5 мМ Mg²⁺, 0,25 мМ dNTP, 5 мкл ДНК (концентрация 100 µg/ml). При амплификации в термоциклере «Терцик» на смесь наслаивали 2 капли минерального масла.

Амплификацию ДНК проводили в термоциклере «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Москва) по программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 с; t° отжига, 10 с; 72°C, 10 с; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; t° отжига, 5 с; 72°C, 5 с. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72°C.

Всего при разработке и апробации методики проанализирован полиморфизм ДНК 450 проб. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле в 1 × TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете (рис. 1). В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды,

Таблица 1

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

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Температура отжига, °С	Размеры фрагментов	Число фрагментов			Доля полиморфных фрагментов		
				1996	1999	контроль	1996	1999	контроль
M1	(AC)8CG	56	260–1345	18	17	15	0,8333*	0,8235*	0,8667
M2	(AC)8CC	56	290–1270	20	19	20	0,8000*	0,8421*	0,9500
M9	(GACAC)4	64	270–1225	19	19	20	0,7895*	0,7368*	0,9500
X9	(ACC)6G	64	235–930	16	16	14	0,8125	0,8125	0,8571
X11	(AGC)6G	64	240–1020	17	15	16	0,8235*	0,8667*	0,9375
всего				90	86	85	0,8111*	0,8140*	0,9176

Примечание: * — $tst > 2,00$ при сравнении с контролем.

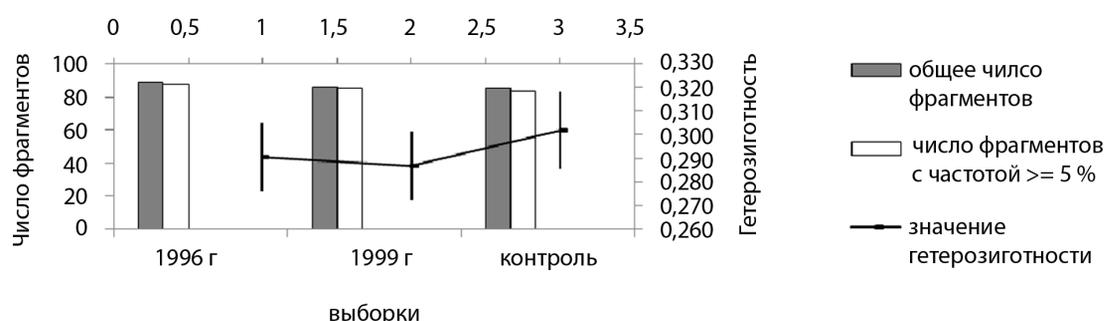


Рис. 2. Характеристика фрагментов ДНК, амплифицированных ISSR-методом, и ожидаемая гетерозиготность в выборках *P. pratensis*

в качестве положительного контроля (К+) — 5 мкл ДНК проверенного образца. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.5 + 3 Kb DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Москва), определение длин фрагментов проводилось с использованием программы «Quantity One» в системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA).

Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью программ PopGen32 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS Excel с определением: доли полиморфных локусов ($p_{0,95}$) (William et al., 1990), общего числа аллелей (n_a), эффективного числа аллелей (n_e) (Kimura et al., 1964), ожидаемой гетерозиготности (H_e) (Nei, 1964) (рис. 2). Уровень внутривидового разнообразия оценен через показатели среднее число морф (μ) и доля редких морф (h) (Животовский, 1980). Достоверность различий между показателями генетической изменчивости определялась по критериям Стьюдента и Фишера при уровне достоверности 0,95 (Урбах, 1964; Плохинский, 1969).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для проведения анализа генетической изменчивости растений при нефтяном загрязнении на примере *P. pratensis* рекомендуется методика выделения ДНК

А. М. Torres et al. (1993) с применением СТАВ, которая позволила выделить ДНК без примесей фенолов. Для амплификации ДНК отобраны 5 наиболее информативных ISSR праймеров из 20, синтезированных в ЗАО «Синтол» (Москва).

При апробации модифицированного ISSR-метода на особях *P. pratensis* было установлено, что с помощью одного ISSR-праймера, в среднем, было амплифицировано 17 фрагментов ДНК. Число амплифицированных с помощью 5 ISSR-праймеров фрагментов ДНК варьировало для выборки особей с контрольной площадки от 14 (праймер X9) до 20 (праймеры M2, M9) и для выборки особей с экспериментальной площадки от 15 (праймер X11) до 20 (праймер M9). Фрагменты были отнесены к мономорфным, если частота их встречаемости была $> 0,95$ (Хедрик, 1964). Фрагменты с меньшей частотой встречаемости были отнесены к полиморфным. Оценка значимости разницы долей полиморфных локусов проводилась с помощью χ -критерия, который определяет значимость двух выборочных долей (Урбах, 1964). При сравнении уровня полиморфизма особей контрольных и опытных площадок 1996 и 1999 гг χ -критерий равен 2,12 и 2,03 соответственно. Эти значения превышают критическое ($\chi_{0,05} = 1,96$), следовательно, генетическое разнообразие на экспериментальных нефтезагрязненных площадках достоверно ниже, чем на контрольных площадках (табл. 1).

Таблица 2

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

Давность загрязнения	па	пе	He	Показатели внутривидового разнообразия	
				μ	h
12 лет	1,9255 (0,2639)	1,4665 (0,2890)	0,290 (0,015)	$1,765 \pm 0,012$	$0,117 \pm 0,006$
9 лет	1,8936 (0,3100)	1,4498 (0,2776)	0,287 (0,015)	$1,786 \pm 0,012$	$0,107 \pm 0,006$
Контроль	1,8830 (0,3232)	1,4972 (0,3193)	0,302 (0,016)	$1,816 \pm 0,011$	$0,092 \pm 0,006$

Примечание: па — абсолютное число аллелей на локус; пе — эффективное число аллелей на локус; He — ожидаемая гетерозиготность; в скобках даны стандартные отклонения.
 μ — среднее число морф; h — доля редких морф.

Доли полиморфных маркеров у выборок 9- и 12-летней давности отличаются статистически не значимо.

Растения, произрастающие на экспериментальных площадках, характеризуются также меньшим числом эффективных аллелей, меньшей ожидаемой гетерозиготностью и меньшей долей редких морф (табл. 2). Доля редких морф по Животовскому Л. А. отражает сумму доли морф с редкими маркерами и доли морф, у которых, наоборот, отсутствуют маркеры, характерные для подавляющего большинства других особей выборки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия *P. pratensis* методом ISSR-маркирования позволило выявить более 90 маркеров. На их основе рассчитан комплекс показателей, определяющих уровень генетического разнообразия. Путем сопоставления аналогичных показателей растений, произрастающих под воздействием экспериментального нефтяного загрязнения и без него, подтверждено, что растения *P. pratensis*, произрастающие в условиях нефтяного загрязнения почв, характеризуются пониженным уровнем генетического разнообразия. Докazanное в данной работе снижение доли редких морф и ожидаемой гетерозиготности потенциально может быть особенно опасно, так как именно генетическое разнообразие определяет адаптивный потенциал живых организмов и является компонентом устойчивости вида в изменяющихся условиях окружающей среды.

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

Литература

1. Анишькина М. В., 2006. Мутагенный и токсический эффекты у растений *Tradescantia* (сноп 02) и *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., индуцированные нефтью и нефтепродуктами: Автореф. канд. дис. Сыктывкар. 20 с.
2. Лузев В. С., Левин С. В., Селецкий Г. И. и др., 1989. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязненных почв // Микроорганизмы и охрана почв / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М.: изд-во МГУ. С. 129–150.
3. Железнова Г. В., Кузнецова Е. Г., Евдокимова Т. В. и др., 2005. Мониторинг формирования растительного покрова на техногенно-нарушенных территориях Усинского нефтяного месторождения / Экология. № 4. С. 269–274.
4. Животовский Л. А., 1980. Показатель внутривидового разнообразия // Журнал общей биологии. Т. 41. № 6. С. 828–836.
5. Максименко О. Е., Червяков Н. А., Каркишко Т. И. и др., 1997. Динамика восстановления растительности антропогенно нарушенного сфагнового болота на территории нефтепромысла в Среднем Приобье // Экология. № 4. С. 243–247.
6. Назаров А. В., Иларионов С. А., 2005. Потенциал использования микробно-растительного взаимодействия для биоремедиации // Биотехнология. № 5. С. 54–62.
7. Назаров А. В., Иларионов С. А., 2006. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв // Альтернативная генетика и экология. № 1. С. 60–65.
8. Назаров А. В., Иларионов С. А., Азизова Э. А., 2000. Формирование растительности на экспериментальных нефтезагрязненных площадках // Вестн. Перм. Ун-та. Вып. 2. С. 80–84.
9. Плохинский Н. А., 1969. Биометрия. М.: Изд-во МГУ. 368 с.
10. Семериков Л. Ф., Завьялова Н. С., 1990. Влияние нефтяных загрязнений на изменчивость популяций канарейника тростниковидного (*Phalaroides arundinaceae*) // Экология. № 2. С. 31–34.
11. Соболев В. В., Карлов Г. И., Соболева А. Г. и др., 2006. Использование ISSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и паспортизации сортов малины / Сельскохозяйственная биология.
12. Урбах В. Ю., 1964. Биометрические методы. М.: Наука. 416 с.
13. Хазиев Ф. Х., Тишкина Е. И., Киреева Н. А. и др., 1988. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты экосистемы // Агробиохимия. № 2. С. 56–61.
14. Хедрик Ф., 1964. Мир биологии: генетика популяций. М.: Техносфера. 592 с.

15. Шилова И. И., 1977. Первичные сукцессии растительности на техногенных песчаных обнажениях в нефтегазодобывающих районах Среднего Приобья // Экология. № 6. С. 5–15.
16. Шуйцев Ю. К., 1982. Деграция и восстановление растительных сообществ тайги в сфере влияния нефтедобычи // Добыча полезных ископаемых и геохимия природных экосистем. С. 70–81.
17. Julián Mario Penã-Castro, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Luis Fernández-Linares et al., 2006. Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress / Plant Science Vol. 170. P. 724–731
18. Kimura M., Crow J. F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics (US). Vol. 49. P. 725–738.
19. Nei M., 1964. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press. P. 176–187.
20. Torres A. M., Weeden N. F., Martin A., 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // Theor. Appl. Genet. Vol. 5. P. 937–945.
21. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. Vol. 18. P. 6531–6535.

GENETIC VARIABILITY OF PLANTS GROWN ON OILY SOILS INVESTIGATION BY THE USE OF ISSR-MARKERS ON *POA PRATENSIS* L. MODEL

S. V. Boronnikova, S. A. Mandritsa, T. N. Svetlakova, A. V. Nazarov, A. V. Suslonov

✿ **SUMMARY:** In this study we provide evidence of genetic variability decrease of plants grown on oily soils. Genetic variability levels of *Poa pratensis* L. from oily soils were investigated by means of PCR amplification with ISSR primers. On the basis of these indicators it is confirmed, that the plants growing in the conditions of oil pollution of soils, are characterised by the lowered level of a genetic variety.

✿ **KEY WORDS:** genetic variability level; oily soils; DNA-markers polymorphism; ISSR-method; *Poa pratensis* L.

✿ Информация об авторах

Боронникова Светлана Витальевна — к. б. н., доцент.
Пермский Государственный университет.
ул. Букирева, 15, Пермь, 614 990.
E-mail: SVBoronnikova@yandex.ru.

Мандрица Сергей Анатольевич — д. б. н.
Пермский Государственный университет.
ул. Букирева, 15, Пермь, 614 990.
E-mail: Mandrytsa@psu.ru.

Светлакова Татьяна Николаевна — ассистент.
Пермский Государственный университет.
ул. Букирева, 15, Пермь, 614 990.
E-mail: svetlakova@psu.ru.

Назаров Алексей Владимирович — старший научный сотрудник.
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.
ул. Голева, 13, Пермь, 61408.
E-mail: nazarov@iegm.ru.

Суслонов Александр Владимирович — главный специалист отдела лесного контроля и надзора. Государственная инспекция по экологии и природопользованию Пермского края.

Boronnikova Svetlana V. — c. b. s., the senior lecturer of chair of botany and genetics of plants. Biological faculty of the Perm State University.
st. Bukirieva, 15, Perm, Russia, 614 990.
E-mail: SVBoronnikova@yandex.ru.

Mandrytsa Sergei A. — d.s.s., professor.
Biological faculty of the Perm State University.
st. Bukirieva, 15, Perm, Russia, 614 990.
E-mail: Mandrytsa@psu.ru.

Svetlakova Tatiana N. — the assistant to chair of botany and genetics of plants.
Biological faculty of the Perm State University.
st. Bukirieva, 15, Perm, Russia, 614 990.
E-mail: svetlakova@psu.ru.

Nazarov Aleksei V. — c.b.s., senior scientific employee Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS.
st. Goleva, 13, Perm, Russia, 614 08.
E-mail: nazarov@iegm.ru.

Suslonov Aleksandr V. — The main expert of a department of the wood control and supervision. The state inspection on ecology and a natural management of the Perm edge.