

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *LYCHNIS FLOS-CUCULI* В ГРАДИЕНТЕ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

О.В. Дуля

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург

Ключевые слова: генетическая изменчивость, микросателлитные маркеры, популяция, тяжелые металлы, *Lychnis flos-cuculi*.

Популяции растений загрязненных местообитаний представляют собой очень удобные модели для изучения процессов микроэволюции. Начиная с 1970-х годов изучению их генетической изменчивости посвящено множество работ. В одних (Bush, Barrett, 1993; Vekemans, Lefebvre, 1997; Nordal et al., 1999; Mengoni et al., 2001) показано, что генетическое разнообразие популяций загрязненных зон ниже, чем контрольных, что согласуется с предположениями о жестком отборе при высокой токсической нагрузке, в других (Wu et al., 1975; Ducouso et al., 1990) получены противоположные результаты, которые приводят к заключению, что давление естественных факторов (например, конкуренции) в чистых местообитаниях сильнее токсического пресса в загрязненных. Такая противоречивость затрудняет обобщение и диктует необходимость как дальнейшего накопления информации в области экологической генетики популяций импактных регионов, так и более глубокого изучения механизмов и причин выявленных закономерностей.

Объект данного исследования *Lychnis flos-cuculi* L. (Caryophyllaceae) [ITIS № 20309, IPNI № 155082–1; $2n = 24$; синонимы: *Silene flos-cuculi* (L.) Clairv., *Coronaria flos-cuculi* (L.) Braun, *Coccyganthe flos-cuculi* Rchb.] — горичвет обыкновенный — космополит; аборигенное для России двулетнее или многолетнее розеточное растение, характерное для сырых мезотрофных лугов (Chaloupecká, Leps, 2004). Цветение происходит в мае — июне, продолжается до августа (Серебряков, 1952). Опыление преимущественно перекрестное, осуществляется насекомыми.

Данная работа посвящена оценке внутривидовой генетической изменчивости и реконструкции истории популяций *L. flos-cuculi* в трех зонах загрязнения выбросами Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ, г. Ревда, Свердловская обл.): фоновой, удаленной от источника загрязнения на 30 км, буферной (т.е. умеренно загрязненной), расположенной в 4 км от завода, и импактной (сильно загрязненной) — в 1–1.5 км от завода. Влияние выбросов СУМЗ на окружающую территорию изучено многосторонне

(Воробейчик и др., 1994). Подробно условия на исследуемых участках описаны ранее (Дуля, Микрюков, 2013; Дуля и др., 2013).

В работах, посвященных генетическим процессам в естественных и искусственных популяциях *L. flos-cuculi*, этот вид стоит в одном ряду с другими традиционными модельными объектами экологической генетики. Однако, несмотря на способность произрастать и даже увеличивать обилие на промышленно нарушенных территориях (Воробейчик и др., 1994; Трубина, Дуля, 2007), популяциям *L. flos-cuculi* из импактных регионов уделено очень мало внимания.

Ранее было показано, что при почти полной элиминации других видов луговых растений обилие *L. flos-cuculi* вблизи СУМЗа чрезвычайно велико по сравнению с буферной и фоновой зонами (Трубина, Дуля, 2007). В популяциях *L. flos-cuculi* импактной зоны также документирована повышенная металлоустойчивость (Дуля и др., 2013). Соответственно представляет интерес изучение популяционно-генетических механизмов приспособления *L. flos-cuculi* к промышленному загрязнению.

Термином «популяция» в данной работе обозначена группировка особей в пределах одной зоны загрязнения, изолированная от аналогичных группировок чередой лесных массивов протяженностью более 3 км. Входящая в популяцию группа особей из одного местообитания, отделенная лесным массивом и удаленная от других таких же групп на 50 м и более, обозначена как «ценопопуляция».

На изучаемых загрязненных участках из-за высокого содержания тяжелых металлов в почве токсическая нагрузка превышает фоновый уровень в десятки и сотни раз (Дуля и др., 2013). Учитывая сильный длительный токсический пресс в течение 70 лет работы СУМЗа, мы предположили, что генетическая изменчивость в популяциях *L. flos-cuculi* снижается в градиенте загрязнения.

С другой стороны известно, что генетическое разнообразие *L. flos-cuculi* может снижаться при фрагментации местообитаний, т.е. при ограничении потока генов между соседними ценопопуляциями, а также уменьшении их размеров (Jensen, Meyer, 2001; Bowman et al., 2008; Leimu et al., 2008). На исследуемой нами территории под действием загрязнения происходит изреживание древостоя (Усольцев и др., 2009). Поскольку исследуемые ценопопуляции *L. flos-cuculi* населяют луга, сформировавшиеся на лесных полянах, то изреживание разделяющих их лесных массивов ведет к дефрагментации местообитаний *L. flos-cuculi*, а также к интенсификации потока генов между соседними ценопопуляциями на загрязненной территории. Соответственно в качестве альтернативной гипотезы можно выдвинуть предположение об увеличении внутривидовой генетической изменчивости *L. flos-cuculi* в градиенте загрязнения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В июле — августе 2012 г. в трех указанных выше зонах загрязнения в девяти ценопопуляциях (по три на зону) проведен сбор семян, а также образцов листьев и стеблей со взрослых растений. Образцы листьев были высушены при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния и заморожены при -20°C для последующего генетического анализа. В феврале 2013 г. в условиях оптимального питания (садовый почвогрунт «Гумимакс», Россия), влажности, температуры и освещения с каждого материнского растения было пророщено по 20 семян. Через 80 дней с выросших растений были собраны, высушены и заморожены листья для генотипирования. Таким образом, из каждой ценопопуляции генотипировано по 15 особей родительского поколения, тогда как семенное потомство представлено 115, 143 и 124 особями соответственно в ценопопуляциях № 1, № 2 и № 3, в фоновой зоне; 53, 75 и 61 — в буферной; 183, 158 и 147 — в импактной. Всего в анализ включено 1194 особи.

Генотипирование проведено на основе шести микросателлитных маркеров ядерной ДНК (табл. 1) по методике (Galeuchet et al., 2002; Aavik et al., 2012). Нами были разработаны два варианта мультиплексной полимеразной реакции (ПЦР). Характеристика мультиплексов, а также входящих в них генетических маркеров, приведена в табл. 2.

Экстракцию общей ДНК осуществляли из воздушно-сухих образцов массой 16–25 мг с помощью набора AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Гомогенизацию предварительно замороженных в жидком азоте образцов проводили с использованием вибрационной мельницы MM 400 (Retsch, Германия) в течение 30 с при амплитуде 30 Гц. Амплификацию ДНК осуществляли в мультиплексах с использованием набора для ПЦР Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Нидерланды) и термоциклера GeneAmp 2720 (Applied Biosystems, США) в реакционном объеме 10 мкл. Протокол изложен в табл. 2.

Капиллярный электрофорез с флуоресцентной детекцией проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI-3130 (Applied Biosystems) в полимере POP-7 (Applied Biosystems). Размеры пиков оценены в ПО GeneMapper v. 3.7 (Applied Biosystems) относительно маркера молекулярного веса S450 (Синтол, Россия) или LIZ-500 (Applied Biosystems).

Расчет разнообразия родительского поколения проведен по имеющимся полным выборкам. Из-за большого размера и структурированности выборок семенного потомства параметры его разнообразия рассчитаны для случайных выборок, состоящих из 15 особей, изъятых из каждой ценопопуляции по 1000 раз. Расчеты выполнены в ПО R v. 3.1.0 (R Development Core Team, 2014).

ТАБЛИЦА 1. Характеристика микросателлитных локусов *L. flos-cuculi*

Локус	Последовательность праймеров 5' – 3'		Флуоресцентная метка	№ в GenBank
Мультиплекс 1				
<i>Cuculi 12</i>	F R	CATGGTTGTCGACTTGTTCGTAG AACCCCTAAATCCCCTCTCACC	FAM	AF469941
<i>Cuculi 4</i>	F R	TCGGGAAACCGAGCATATAG GTGCAGAGAGGTGAGGAAGG	FAM	AF469938
<i>Cuculi 8</i>	F R	GGTGCATGAGTAACCTTTGTTG CAAATAACCTACGCACGCATAC	ROX	AF469940
<i>Cuculi 13</i>	F R	CTGCAAAACAATCTTCAAATGC CTGCTTTTTGATCGAGATATGG	HEX	AF469942
<i>Cuculi 19</i>	F R	CAGCGCTAAGGTACTCGTATTG GTTAGAACGCGTTGTGAAGCTA	HEX	AF469944
Мультиплекс 2				
<i>Cuculi 17</i>	F R	CCAGGCTGTCATCCTAACAAC AATTACCCCAACCAACGCCCCC	ROX	AF469943
<i>Cuculi 5</i>	F R	TGCGTCAGCGAGTTTAGTGA ACTTCCATGTTCGACGAATCC	FAM	AF469939

Примечание: F – прямой праймер (во всех случаях несет флуоресцентную метку на 5' конце); R – обратный праймер; № в GenBank – инвентарный номер в системе Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ТАБЛИЦА 2. Условия проведения ПЦР

Этап ПЦР	Мультиплекс 1	Мультиплекс 2
Активация полимеразы	95°C (15 мин)	95°C (15 мин)
Количество циклов	30	30
Денатурация ДНК	94°C (30 с)	94°C (30 с)
Отжиг ДНК-затравок	62°C (90 с)	64°C (90 с)
Синтез ДНК	72°C (60 с)	72°C (60 с)
Финальная элонгация	72°C (30 мин)	72°C (30 мин)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Информативность использованной системы маркеров. Лocus *Cuculi 13*, демонстрировавший полиморфизм в европейских популяциях *L. flos-cuculi* (Galeuchet et al., 2002), оказался мономорфным, поэтому он был исключен из дальнейшего анализа. Пять остальных маркеров в среднем имели по 9.3 аллели, тем самым демонстрируя высокую чувствительность при идентификации генотипов. Распределение количества аллелей по локусам неравномерно (табл. 3): максимальное количество аллелей обнаружено для локуса *Cuculi 12*, и всего три аллели для *Cuculi 8*. Информативность всех маркеров, за исключением *Cuculi 8*, сходна.

ТАБЛИЦА 3. Показатели информационной насыщенности генетических данных

Параметр	<i>Cuculi 12</i>	<i>Cuculi 4</i>	<i>Cuculi 8</i>	<i>Cuculi 17</i>	<i>Cuculi 5</i>	Среднее по локусам
N_a	14.8 ± 0.8	8.9 ± 0.2	3.0 ± 0	13.2 ± 0.5	6.7 ± 0.4	9.3 ± 0.7
N_e	3.5 ± 0.5	4.6 ± 0.5	1.7 ± 0.2	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.2
I	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1

Примечание: Указаны среднее значение \pm стандартная ошибка; учетная единица – ценопопуляция ($n = 9$; при среднем количестве особей в ценопопуляции 156.8 ± 5.2); выборка включает как родительские растения *L. flos-cuculi*, так и их потомство. N_a и N_e – наблюдаемые и ожидаемые количества аллелей на локус, I – индекс Шеннона.

Внутрипопуляционное генетическое разнообразие. Аллельное разнообразие (рис. 1 а, б), а также доля гетерозигот (рис. 1 в, г) в ценопопуляциях импактной зоны ниже, чем на буферной и фоновой территориях, причем как в родительском поколении, так и в потомстве. Это подтверждает нашу основную рабочую гипотезу и свидетельствует об эффекте основателя в ходе заселения местообитаний вблизи завода или в результате элиминации значительной части популяции, например из-за токсического стресса, а также о повышенной частоте инбридинга в течение времени работы завода.

Значения индекса фиксации Райта (F_{IS}) в ценопопуляциях импактной зоны, как правило, ниже, чем в фоновой и буферной. В обоих поколениях для фоновой и буферной территорий F_{IS} близок к нулю: зарегистрированы невысокие положительные значения в потомстве и отрицательные – в родительском поколении (рис. 2). Положительные F_{IS} свидетельствуют о недостатке гетерозигот в ценопопуляциях, который может быть вызван повышением частоты инбридинга

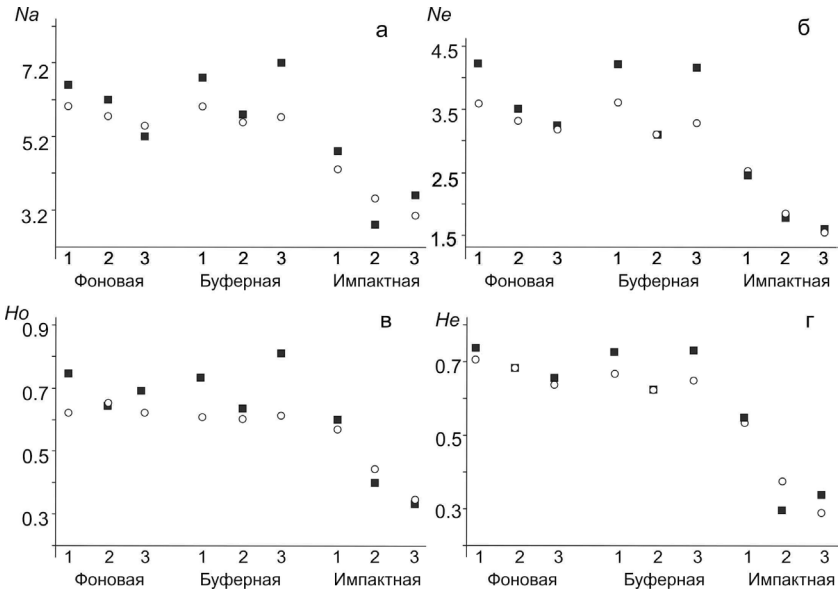


Рис. 1. Параметры внутрипопуляционного разнообразия *L. flos-cusuli*, рассчитанные для разных поколений. На оси абсцисс – зона загрязнения и номер ценопопуляции в ней; квадраты – родительское поколение, круги — семенное потомство; N_a и N_e – наблюдаемые и ожидаемые количества аллелей на локус; H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая доля гетерозигот.

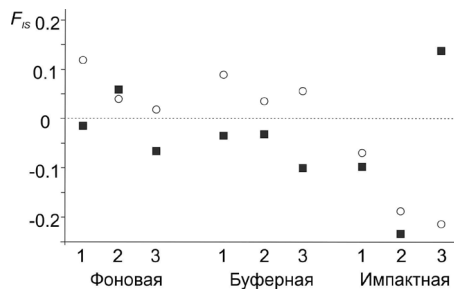


Рис. 2. Коэффициенты инбридинга в ценопопуляциях *L. flos-cusuli*, рассчитанные для разных поколений.

На оси абсцисс – зона загрязнения и номер ценопопуляции в ней; квадраты – родительское поколение, круги – семенное потомство; F_{IS} – коэффициент инбридинга Райта ($F_{IS} = 1 - H_o/H_e$, где H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность).

в ближайшем прошлом. Отрицательные F_{IS} , наоборот, указывают на избыток гетерозигот и соответственно на повышение частоты ауткроссинга в ближайшем прошлом (Rousset, 2002).

Для ценопопуляций №1 и №2 импактной зоны показаны отрицательные F_{IS} как в родительском поколении, так и в потомстве, что свидетельствует о повышенной частоте ауткроссинга по сравнению с популяциями фоновой и буферной зон. В то же время для ценопопуляции №3 импактной зоны характерно максимальное значение F_{IS} в родительском поколении, указывающее на его высокую степень инбредности, и вместе с тем наиболее низкое из всех полученных значение F_{IS} в потомстве, свидетельствующее об избытке гетерозигот в этом поколении.

Полученные результаты могут быть хорошо интерпретированы с точки зрения временной динамики условий среды в исследуемых местообитаниях. За последние два десятилетия произошло снижение выбросов медеплавильного завода с 225 до 5 тыс. т в год (Воробейчик и др., 2014). И хотя содержание кислоторастворимых форм тяжелых металлов в корнеобитаемом слое почвы загрязненных зон не уменьшилось (Трубина и др., 2014), снижение атмосферных выбросов обуславливает снижение токсического пресса на растения как напрямую (уменьшение концентраций газообразных поллютантов), так и косвенно — через повышение рН почвы и соответственно снижение биодоступности тяжелых металлов. Вероятно, по этой причине в течение последних 10 лет происходит «олуговение» импактной территории, т.е. зарастание исследуемых участков *Agrostis capillaris* и *L. flos-cuculi*, а в отдельных локалитетах и другими луговыми видами. При этом уровень межвидовой конкуренции в импактной зоне ниже, чем в фоновой и буферной, тогда как плотность особей *L. flos-cuculi* намного выше.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать вывод об эффекте основателя и повышенной частоте инбридинга в истории популяции импактной зоны. Вместе с тем для нее отмечено снижение частоты инбридинга в недавнем прошлом по сравнению с популяциями фоновой и буферной зон.

На наш взгляд, наиболее интересные результаты получены для ценопопуляции №3 в импактной зоне. Низкое аллельное разнообразие, свидетельствующее о сильно выраженном (или недавнем) эффекте основателя, и высокое значение F_{IS} для взрослых особей, указывающее на высокую частоту инбридинга в истории этой ценопопуляции, а также наиболее низкое значение F_{IS} в последнем поколении можно рассматривать как квинтэссенцию популяционно-генетических процессов *L. flos-cuculi* в импактной зоне.

Автор выражает признательность В.С. Микрюкову, Е.Л. Воробейчику, М.В. Модорову, В.Л. Семерикову и коллективу лаборатории молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН за помощь при генетическом анализе и в обсуждении результатов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 14-04-31345, 12-04-32116), а также Программы развития ведущих научных школ (НШ-2840.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воробейчик Е.Л., Трубина М.Р., Хантемирова Е.В., Бергман И.Е. Многолетняя динамика лесной растительности в период сокращения выбросов медеплавильного завода // Экология. 2014. № 6 (в печати).
- Воробейчик Е.Л., Садыков О.Ф., Фарафонов М.Г. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем. Екатеринбург: УИФ «Наука», 1994. 280 с.
- Дуля О.В., Микрюков В.С. Изменение формы и размера листьев *Lychnis flos-cuculi* L. в градиенте полиметаллического загрязнения // Вестн. ТГУ. Сер. «Естественные и гуманитарные науки». 2013. Т. 18. № 3. С. 778–782.
- Дуля О.В., Микрюков В.С., Воробейчик Е.Л. Стратегии адаптации *Deschampsia caespitosa* и *Lychnis flos-cuculi* к загрязнению тяжелыми металлами: анализ на основе зависимости доза–эффект // Экология. 2013. № 4. С. 243–253.
- Серебряков И.Г. Морфология вегетативных органов высших растений. М.: Сов. наука, 1952. 393 с.
- Трубина М.Р., Воробейчик Е.Л., Хантемирова Е.В. и др. Динамика лесной растительности после снижения промышленных выбросов: быстрое восстановление или продолжение деградации? // Доклады РАН. 2014 (в печати).
- Трубина М.Р., Дуля О.В. Особенности изменения численности локальных популяций и характера размещения особей луговых видов в окрестностях медеплавильного завода // Мат-лы междунар. конф. Екатеринбург: изд-во Урал. ун-та. Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель. 2007. С. 639–649.
- Усольцев В.А., Воробейчик Е.Л., Хантемирова Е.В. и др. Исследование биологической продуктивности насаждений по градиентам аэрозагрязнений: методический анализ и перспективы // Вестн. МарГТУ. Сер. «Лес. Экология. Природопользование». 2009. № 2. С. 67–76.
- Aavik T., Edwards P.J., Holderegger R. et al. Genetic consequences of using seed mixtures in restoration: A case study of a wetland plant *Lychnis flos-cuculi* // Biological Conservation. 2012. V. 145. № 1. P. 195–204.
- Bowman G., Perret C., Hoehn S. et al. Habitat fragmentation and adaptation: a reciprocal replant-transplant experiment among 15 populations of *Lychnis flos-cuculi* // J. of Ecology. 2008. V. 96. № 5. P. 1056–1064.
- Bush E.J., Barrett S.C.H. Genetics of Mine Invasions by *Deschampsia cespitosa* (Poaceae) // Canad. J. of Botany. 1993. V. 71. № 10. P. 1336–1348.
- Chaloupecká E., Leps J. Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa* // Flora. 2004. V. 199. № 2. P. 157–167.

- Ducouso A., Petit D., Valero M., Vernet P. Genetic-variation between and within populations of a Perennial Grass: *Arrhenatherum elatius* // Heredity. 1990. V. 65. P. 179–188.
- Galeuchet D.J., Husi R., Perret C. et al. Characterization of microsatellite loci in *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae) // Molecular Ecology Notes. 2002. V. 2. № 4. P. 491–492.
- Jensen K., Meyer C. Effects of light competition and litter on the performance of *Viola palustris* and on species composition and diversity of an abandoned fen meadow // Plant Ecology. 2001. V. 155. № 2. P. 169–181.
- Leimu R., Kloss L., Fischer M. Effects of experimental inbreeding on herbivore resistance and plant fitness: the role of history of inbreeding, herbivory and abiotic factors // Ecology Letters. 2008. V. 11. № 10. P. 1101–1110.
- Mengoni A., Barabesi C., Gonnelli C. et al. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis // Molecular Ecology. 2001. V. 10. № 8. P. 1909–1916.
- Nordal I., Haraldsen K.B., Ergon A., Eriksen A.B. Copper resistance and genetic diversity in *Lychnis alpina* (Caryophyllaceae) populations on mining sites // Folia Geobotanica. 1999. V. 34. P. 471–481.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Rousset F. Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measure? // Heredity. 2002. V. 88. P. 371–380.
- Vekemans X., Lefebvre C. On the evolution of heavy-metal tolerant populations in *Armeria maritima*: Evidence from allozyme variation and reproductive barriers // Journal of Evolutionary Biology. 1997. V. 10. № 2. P. 175–191.
- Wu L., Thurman D.A., Bradshaw A.D. The uptake of copper and its effects upon respiratory processes of roots of copper-tolerant and non-tolerant clones of *Agrostis stolonifera* // New Phytologist. 1975. V. 75. P. 225–230.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

ЭКОЛОГИЯ: популяция, вид, среда

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

14 – 18 апреля 2014 г.
ЕКАТЕРИНБУРГ

УДК 574 (061.3)

Э 40

*Материалы конференции изданы при финансовой поддержке
Президиума Уральского отделения РАН (проект № 14-4-МШ-32)
и Российского фонда фундаментальных исследований
(проект № 14-04-06811).*

Экология: популяция, вид, среда. Материалы конф. молодых ученых, 14 – 18 апреля 2014 г. / ИЭРиЖ УрО РАН – Екатеринбург: Гощицкий, 2014. – 176 с.

В сборнике опубликованы материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: популяция, вид, среда». Мероприятие проходило в Институте экологии растений и животных УрО РАН с 14 по 18 апреля 2014 г. Работы посвящены проблемам изучения биологического разнообразия на популяционном, видовом и экосистемном уровнях, анализу экологических закономерностей эволюции, поиску механизмов адаптации биологических систем к экстремальным условиям, а также популяционным аспектам экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.

ISBN 978-5-98829-047-6

© Авторы, 2014

© ИЭРиЖ УрО РАН, 2014

© Оформление. Издательство «Гощицкий», 2014