

УДК 594

Цветков И.Л.

Московский государственный областной университет

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК И ПРИЧИН ВНУТРИВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА МОЛЛЮСКОВ

I. Tsvetkov

Moscow Regional State University

THE ANALYSIS OF MICROSATELLITE DNA DISTRIBUTION AND THE REASONS OF SNAIL INTRASPECIFIC POLYMORPHISM

Аннотация. У моллюска живородка речная (*Viviparus viviparus* L.) выявлены наборы ПЦР-фрагментов межмикросателлитной ДНК. Показано, что распределение микросателлитной ДНК в геноме характеризуется внутривидовым полиморфизмом и отличается у представителей отдельных изолированных популяций моллюска. Исследованы популяции, обитающие в различных акваториях, и установлено, что состав полиморфных межмикросателлитных ПЦР-фрагментов живородки в этих популяциях коррелирует с условиями обитания и интенсивностью техногенной нагрузки на водоем.

Ключевые слова: микросателлитная ДНК, ДНК-штрих-кодирование, молекулярный полиморфизм, экологическая генетика, техногенное воздействие, генетическая адаптация.

Abstract. Sets of PRC fragments of intermicrosatellite DNA are isolated from the river snail *Viviparus viviparus* L. It is shown that the distribution of microsatellite DNA in genomes is characterized by intraspecific polymorphism and differs between the representatives of some isolated snail populations. The populations living in various water areas are investigated. It is found that the sets of polymorphous intermicrosatellite PCR fragments of the river snail correlates with the habitat conditions and the intensity of the anthropogenic stress of the water ecosystem.

Key words: microsatellite DNA, DNA-fingerprinting, molecular polymorphism, ecological genetics, anthropogenic impact, genetic adaptation.

Различные последовательности ядерной ДНК эукариот, особенно не транскрибируемые, довольно давно находятся в центре внимания молекулярных генетиков. Изменчивость в этой области ДНК не отражается на фенотипе и беспрепятственно накапливается в популяциях, благодаря чему даже у отдельных особей формируется уникальная первичная структура генома, своеобразный отпечаток пальцев или штрих-код (оба термина взяты из литературных источников). Этот штрих-код имеет большое значение, например, для идентификации личности, сортов культурных растений и пород домашних животных и решения других прикладных задач [4], однако играет весомую роль и в фундаментальных исследованиях. Дело в том, что мутации, хоть и существенно реже, но появляются и в половых клетках, вследствие чего уникальные последовательности ДНК становятся способны к вертикальному переносу и формируют характерный генофонд отдельных популяций, видов и других систематических групп. Исследование уникальных последовательностей, производимое методами кластерного анализа, позволяет охарактеризовать филогенетические отношения групп особей практически любого уровня, главное, чтобы эти группы имели какие-либо естественные границы своего распространения (непреодолимые препятствия или расстояния, различия в сроках или способах размножения и т. д.) [5].

Однако возможна и другая трактовка результатов, которые получаются из анализа первичной структуры ядерной (а также и митохондриальной) ДНК. Заключается она в исследовании

молекулярно-генетического полиморфизма, который является следствием обитания в различных экологических условиях. Собственно мутационный процесс и формирование индивидуальной наследственности, обусловленные случайными явлениями или эндогенными факторами, происходят в любых условиях обитания, но, безусловно, ускоряются при усилении техногенной нагрузки. Причин тому может быть несколько, это непосредственное влияние некоторых токсиантов (мутагены) или физических факторов (например, ультрафиолетовое или радиационное излучение) на структуру ДНК, а также действие, оказываемое опосредованно через нарушение правильной репликации, своевременной репарации, и, наконец, направленные молекулярные процессы более высокого уровня, которые могут иметь адаптивное значение или быть следствием ослабления защитных свойств клетки [1, 3]. Так или иначе, в экстремальных или неблагоприятных условиях обитания техногенный мутационный процесс должен преобладать над естественным. В соответствие с этим индивидуальная изменчивость и молекулярно-генетический полиморфизм должны быть выше в тех популяциях, которые испытывают большую техногенную нагрузку, и меньше – где условия существования близки к оптимальным.

На основании этого предположения мы построили следующую схему исследования. Выбрали два водоема, близких по гидрологическим параметрам, но контрастных по степени загрязненности промышленными отходами. Сравнительно чистым водоемом служила р. Клязьма в границах Владимирской области выше г. Владимира, загрязненным водоемом – р. Которосль, точнее, её приустьевой участок в черте г. Ярославля. Чистоту Клязьмы подтверждали сообщения местных жителей и наши наблюдения, сделанные на основании видового состава водной и прибрежноводной растительности. Высокая загрязненность приустьевого участка Которосли была доказана нами рядом специальных гидробиологических и биохимических исследований [2]. В июле-августе 2009 г. на нескольких станциях

в указанных водоемах собрали по 8-10 особей речной живородки (*Viviparus viviparus* L.: Viviparidae, Architaenioglossa, Gastropoda, Mollusca). Молекулярному анализу подвергали улиток строго индивидуально, используя одноразовые инструменты, посуду и другие приспособления. ДНК выделяли из мышц передней части ноги, которые измельчали с помощью микрогомогенизатора в микропробирках Эппендорф с четырьмя объемами лизирующего раствора на основе гуанидинтиоцианата (5,2М). Дальнейшая процедура выделения и очистки ДНК происходила в соответствии с инструкцией к используемому для этого набору реагентов «Ferrosil uni» («Компания «Биоком», Москва), адаптированному для автоматического процессора магнитных частиц KingFisher ml (ThermoFisher, Финляндия). Полученные препараты ДНК непосредственно использовали для ПЦР с олигонуклеотидными праймерами, повторяющими последовательности ранее изученной микросателлитной ДНК. Наиболее удачные из них приведены в таблице. Реакцию проводили в термоциклере Терцик («ДНК-технология», Москва), реакционную смесь готовили из компонентов набора «ПЦР-ядро» («Компания «Биоком») и смеси предварительно разбавленных праймеров собственного дизайна (синтезированы ЗАО «Синтол», Москва), взятых в количестве 10 пмоль каждого на 1 реакцию (табл.).

Характеристики олигонуклеотидных праймеров, использованных для амплификации межмикросателлитных участков ДНК речной живородки

Праймер	Последовательность 5' - 3'	Длина, н.	Температура отжига, °С
1	(TAGA) ₅ T	21	48
2	(ATG) ₇ GA	23	56
3	(GA) ₉ T	19	56
4	(CATA) ₅ GA	22	48

Продукты ПЦР детектировали с помощью электрофореза и характеризовали по молекулярной массе, определяемой с помощью

ДНК-маркеров «Gene Ruler 100 bp DNA Ladder» (Promega Corp.). Из набора амплифицированных фрагментов ДНК, которые выявили у всех использованных для анализа особей улиток, мы исключили консервативные, не имеющие популяционной специфичности и встречающиеся повсеместно, остальные свели в электронную таблицу и подвергли кластерному анализу с помощью программы Statistica 6.0 (по протоколу Clustal). Практически все особи сгруппировались в кластеры, не имеющие заметного удаления друг от друга, поэтому мы объединили их в более крупные, которые полностью совпали с группами, соответствующие станциям сбора материала (огрубление кластеризации произведено для вероятности 0,95). Полученная дендрограмма представлена на рис. 1.

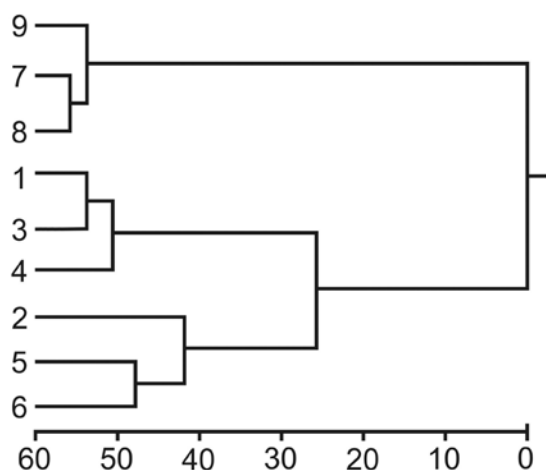


Рис. 1. Дендрограмма распределения особей речной живородки, построенная по составу амплифицированных межмикросателлитных последовательностей ДНК

Цифры 1–6 соответствуют номерам станций сбора на приустьевом участке р. Которосли, 7–9 – на участке р. Клязьмы в границах Владимирской области, по горизонтальной оси – генетическое расстояние в условных единицах. Как мы и предполагали, наименьшими различиями в молекулярной структуре ДНК характеризовались популяции речной живородки, локализованные в непосредственной близости друг от друга, в одном во-

доеме и сходных условиях обитания (1–6 в Которосли, 7–9 в Клязьме), однако, важно учесть, что межпопуляционный полиморфизм живородки в Которосли существенно выше – генетические расстояния между популяциями почти всегда превосходят таковые в Клязьме и не зависят от реальной удаленности популяций друг от друга, т.к. в обоих водоемах улитки были собраны на одинаковых по протяженности участках (около 1,5 км). Это свидетельствует о том, что межпопуляционный полиморфизм в загрязненном водоеме оказывается выше и, следовательно, техногенная нагрузка действительно увеличивает частоту мутаций, способствует углублению внутривидовой дифференциации и увеличению темпов микроэволюции по сравнению с естественными, не измененными человеком условиями обитания. В дальнейшем мы планируем более тщательно исследовать выявленную закономерность и использовать для этого не только большее число станций сбора материала и большее видовое разнообразие, но и более тонкий анализ первичной структуры ДНК (методом секвенирования наиболее полиморфных межмикросателлитных фрагментов), а также более строгие методы математической обработки результатов биологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Инге-Вечтомов С.Г. Экологическая генетика и теория эволюции // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13, №2. С. 362-371.
2. Цветков И.Л., Цветкова М.А., Зарубин С.Л., Семерной В.П., Коничев А.С. Оценка качества сточных и природных вод с помощью биохимического показателя – активности кислой фосфатазы пресноводных моллюсков. // Водные ресурсы. 2006. Т. 33. № 1. С. 62-70.
3. Чибисова Н.В., Долгань Е.К. Экологическая химия: Учебное пособие. Калининград, 1998. 113 с.
4. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия. // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70. № 4. С. 296-315.
5. Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя. Обзор // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 12. С. 1690-1699.