

УДК [575.174.015.3:582.542.1](829.3)

## ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* ИЗ ДВУХ РЕГИОНОВ ПРИМОРСКОЙ АНТАРКТИКИ

И.О. Андреев<sup>1</sup>, Е.В. Спиридонова<sup>1</sup>, С.С. Кирьяченко<sup>2</sup>, И.Ю. Парникоза<sup>1</sup>,  
Д.Н. Майданюк<sup>1,3</sup>, Р.А. Волков<sup>4</sup>, И.А. Козерецкая<sup>2</sup>, В.А. Кунах<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, Украина;

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, г. Киев, Украина;

<sup>3</sup>Луганский национальный университет имени Тараса Шевченко, г. Луганск, Украина;

<sup>4</sup>Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, г. Черновцы, Украина;  
e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua)

Сравнительный анализ последовательностей участка ITS1-2 рДНК *D. antarctica* показал, что после ледникового периода в Антарктику могли мигрировать растения вида с различными генотипами. Применение RAPD-маркеров обнаружило различия в уровне полиморфизма между популяциями *D. antarctica*, расположенными в разных широтах, а также ограниченность обмена генетическим материалом между ними.

**Ключевые слова:** *Deschampsia antarctica*, RAPD-анализ, ITS рДНК, Антарктика.

*Deschampsia antarctica* Desv. является одним из двух аборигенных цветковых растений антарктической флоры, точное время и направление проникновения которых в Антарктику остаются неясными. В связи с этим необходим поиск маркеров, позволяющих прояснить эти вопросы. Целью работы была оценка генетического полиморфизма *D. antarctica* из двух регионов Приморской Антарктики методом RAPD-анализа и путем сравнения нуклеотидных последовательностей ITS рДНК.

### Материалы и методы

Изучено 15 растений *D. antarctica* из Приморской Антарктики, 9 из которых собраны в окрестностях Аргентинских о-ов, а остальные — на о-ве Кинг-Джордж (арх. Южные Шетландские о-ва). Координаты мест сбора растений опубликованы ранее [1, 2]. ДНК выделяли, как описано в работе [3]. Для RAPD-анализа использовали 30 десятинуклеотидных праймеров. ПЦР, разделение продуктов и анализ результатов проводили, как описано ранее [3]. Расчет количества полиморфных локусов, генетических расстояний по Жакарду с последующей кластеризацией всех образцов методом UPGMA, индекса разнообразия Шеннона и молекулярной вариансы (AMOVA) выполняли при помощи программы FAMD 1.21beta [4].

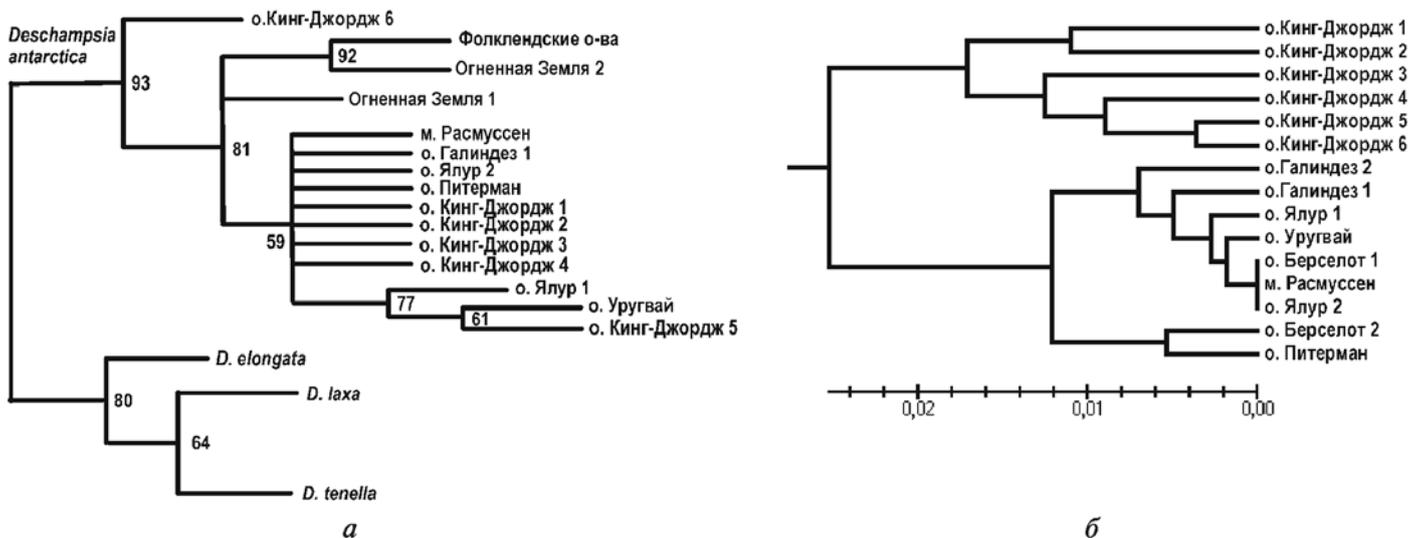
Участок ядерного гена 18S-25S рРНК, включающий ITS1, ген 5.8S рРНК и ITS2, амплифицировали со специфическими праймерами к концевым участкам генов 18S и 25S рРНК [5]. Продукты клонировали с использованием вектора pBluescript II

SK(+). Последовательности ДНК определяли с использованием набора “fmol DNA Cycle Sequencing System” (Promega, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-AVANT. Полученные последовательности депонированы в GeneBank под номерами GU181209—GU181220. Сравнение нуклеотидных последовательностей рДНК и построение дендрограмм проводили с помощью программы PAUP 4.0b10 [6].

### Результаты и обсуждение

**Анализ полиморфизма рДНК.** Определена последовательность клонированного участка рДНК, содержащего ITS1, 5,8S рДНК и ITS2, из 12 растений *D. antarctica*, собранных в разных районах Приморской Антарктики. Длина анализируемого фрагмента была одинаковой для всех клонов, совпадала с размером этого участка рДНК *D. antarctica* из Южной Америки (арх. Огненная Земля и Фолклендские о-ва), представленного в GenBank (AM041213—AM041215), и составляла 595 п.н. ITS1 и ITS2 имели длину 217 и 215 п.н. соответственно. Последовательности клонов сходны на 96,3%, наибольшее количество вариабельных нуклеотидов обнаружено в ITS1 (6,5%), меньшее — в ITS2 (2,3%) и наименьшее — в гене 5,8S рРНК (1,8%).

Методами объединения соседей и максимальной экономии построены дендрограммы, отражающие сходство последовательностей участка ITS1-2 *D. antarctica* из разных популяций (рисунок, а). В качестве внешней группы использовали *D. laxa*, *D. elongata*, *D. tenella* из Ю. Америки и Новой Зеландии, последовательности ITS1-ITS2 которых имеются в Gen-



Дендрограмма, построенная методом объединения соседей для участка ITS1-2 рДНК *D. antarctica* и родственных видов (а). Приведены значения бутстреп-поддержки узлов; Дендрограмма генетического подобия, построенная методом UPGMA на основании коэффициентов Жакарда по результатам RAPD-анализа (б)

Bank (AM041238, AM041230, AM041244). Дендрограммы, построенные обоими методами, были практически идентичны и отличались лишь величинами бутстреп-поддержки отдельных ветвей. Полученные результаты с высокой достоверностью показывают принадлежность изученных представителей *D. antarctica* к одной монофилетической группе.

Сравнение последовательностей показало, что у *D. antarctica* имеется как минимум четыре варианта ITS1-ITS2, отличающихся между собой по отдельным нуклеотидам. Эволюционно исходным был вариант № 1, характерный для растений из Ю. Америки. В большинстве популяций из Антарктики выявлен производный от него вариант № 2, отличающийся одной нуклеотидной заменой в ITS1. Вариант № 3, обнаруженный в трех антарктических образцах (о. Ялур 1, о. Уругвай, о. Кинг-Джордж 5), происходит от варианта № 2, отличаясь от него двумя заменами в ITS1 и ITS2. Наиболее своеобразным является вариант № 4 из образца 6 с о-ва Кинг-Джордж, занимающий на дендрограмме базальное положение (рисунок, а). Он отличается от наиболее близкой к нему последовательности из Ю. Америки (Огненная Земля 1) восемью нуклеотидными заменами, из которых семь приходится на ITS1 и одна — на ITS2.

Считается, что формирование современной флоры Антарктики происходило после окончания последнего оледенения за счет миграции растений из Субантарктики. Полученные данные показывают, что в метапопуляции *D. antarctica* о. Кинг-Джордж присутствуют три варианта рДНК (№ 2, 3 и 4), а у растений с Аргентинских о-ов — два варианта (№ 2 и 3), которые отличаются от варианта № 1, характерного для растений с Огненной Земли и Фолклендских о-ов. Можно предложить два объяснения этим данным: 1) полиморфизм участка ITS1-2 в антарктических популяциях *D. antarctica* обусловлен

неоднократной миграцией растений из генетически различных популяций из-за пределов Антарктики; 2) антарктические варианты ITS1-2 возникли уже на территории Антарктики после иммиграции растений. Второе объяснение представляется логичным для эволюционно производных вариантов № 2 и 3, которые отличаются лишь отдельными мутациями. Появление вариантов № 2 и 3 произошло, очевидно, на ранних этапах колонизации Антарктики, поскольку сегодня оба варианта достаточно широко распространены. В то же время обнаружение на о. Кинг-Джордж уникального варианта № 4 подтверждает представления о формировании генофонда *D. antarctica* в Антарктике на основе нескольких исходных генотипов. Окончательное прояснение происхождения варианта № 4 требует дополнительных исследований с привлечением большего количества образцов растений из разных географических районов.

**RAPD-анализ.** Всего было получено 289 ампликонов, 28 (9,7%) из которых оказались полиморфными. На построенной дендрограмме растения сгруппировались в два кластера в соответствии с географическим происхождением (рисунок, б). Анализ молекулярной вариансы (AMOVA) показал, что географическая удаленность популяций, расположенных на расстоянии около 450 км, позволяет объяснить более половины (58%) генетического полиморфизма проанализированной выборки растений. Четкое деление образцов на две группы свидетельствует об ограниченности обмена генетическим материалом между ними. В то же время внутри групп распределения образцов в соответствии с местом сбора не наблюдается, что указывает на отсутствие существенных барьеров репродуктивной изоляции в пределах каждой географической группы. Последнее можно объяснить переносом растений и семян *D. antarctica* на небольшие расстояния между островами птицами.

Между двумя географическими группами популяций *D. antarctica* обнаружены отличия в уровне генетического полиморфизма: доля полиморфных фрагментов для растений с Аргентинских о-ов составила 3,4%, а для растений с о. Кинг-Джордж — 6,2%; значение индекса Шеннона, характеризующего генное разнообразие, — 0,015 и 0,024 соответственно. Эти отличия контрастируют еще больше, если учесть размер территории сбора образцов. Растения с о. Кинг-Джордж собраны на небольшом участке вблизи польской станции “Арцтовский”, за исключением одного образца (№ 6) из окрестностей бразильской станции “Команданте Ферраз”, удаленной примерно на 9 км. Образцы второй группы собраны с нескольких островов, расстояние между самыми удаленными из которых (о-ва Берселот и Питерман) около 17 км. Можно назвать, по крайней мере, две причины выявленных различий в уровне генетического полиморфизма между группами растений с о. Кинг-Джордж и Аргентинских о-ов. Одна — более позднее заселение последних и проявление эффекта основателя. С этим вполне согласуется обнаружение на о. Кинг-Джордж уникального варианта ITS1-2, которое указывает, что генофонд этой метапопуляции, вероятно, формировался на основе более разнообразного материала в результате скрещивания между растениями, имеющими различное происхождение.

Другой причиной сравнительно низкого генетического разнообразия растений Аргентинского архипелага можно считать более суровые климати-

ческие условия (этот район расположен примерно на 330 км дальше от экватора), воздействие которых проявляется в более жестком естественном отборе либо периодическом сокращении численности популяций, результатом чего является снижение генетической гетерогенности.

### Выводы

Сравнительный анализ последовательностей участка ITS1-2 рДНК показал присутствие в антарктических популяциях *D. antarctica* вариантов, отличающихся специфическими мутациями от растений с Огненной Земли и Фолклендских о-вов. Обнаруженный в антарктических популяциях полиморфизм рДНК можно объяснить как объединением различных генотипов, попавших сюда в результате нескольких миграций, так и позднейшим появлением новых мутаций. RAPD-методом выявлена принадлежность изученных растений к двум группам в соответствии с географическим происхождением, а также установлены различия в уровне генетического полиморфизма между популяциями, расположенными в разных широтах.

\* \* \*

Работа выполнена при поддержке Украинского Национального Антарктического центра, Отдела биологии Антарктики Польской академии наук и лично проф. S. Rakus-Suszczewski, а также гранта Президента Украины для молодых ученых (GP/F11/0048).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parnikoza I.Yu., Miryuta N.Yu., Maidanyuk D.N., Loparev S.A., Korsun S.G., Budzanivska I.G., Shevchenko T.P., Polischuk V.P., Kunakh V.A., Kozeretska I.A. Habitat and leaf cytogenetic characteristics of *Deschampsia antarctica* Desv. in the Maritime Antarctica // *Polar Science*. 2007. Vol. 1. P. 121–128.
2. Kozeretska I.A., Parnikoza I.Yu., Mustafa O., Tyschenko O.V., Korsun S.G., Convey P. Development of Antarctic herb tundra vegetation near Arctowski station, King George Island // *Polar Science*. 2010. Vol. 3. P. 254–261.
3. Спиридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев И.О., Кунах В.А. Стабильность генома высокопродуктивной клеточной линии K-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. при изме-

нении условий выращивания // *Biopolymers and Cells*. 2007. Т. 23. № 2. С. 86–92.

4. Schlüter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. Vol. 6. P. 569–572.

5. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications* / Eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, T. White. San Diego: Academic Press, 1990. P. 315–322.

6. Swofford D.L. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4. Champaign, Illinois: National Illinois History Survey, 2002.

Поступила в редакцию  
10.04.10

### POPULATION GENETIC ANALYSIS OF *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* FROM TWO REGIONS OF MARITIME ANTARCTICA

I.O. Andreev, E.V. Spiridonova, S.S. Kyryachenko, I.Yu. Parnikoza, D.N. Maidaniuk, R.A. Volkov, I.A. Kozeretska, V.A. Kunakh

Comparative sequence analysis of the ITS1-2 region of the rDNA of *D. antarctica* indicate that genetically distinct plants of the species migrated to Antarctica during the post-glacial period. Ap-

plication of RAPD-markers revealed the difference in the levels of polymorphism between populations of *D. antarctica* from different latitudes as well as the limited gene flow between them.

**Key words:** *Deschampsia antarctica*, RAPD-analysis, ITS rDNA, Antarctica.

#### Сведения об авторах

*Андреев Игорь Олегович* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Тел. +380445260798; e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

*Спиридонова Екатерина Васильевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ИМБиГ НАНУ. Тел. +380445260798; e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

*Кирьяченко Сергей Сергеевич* — канд. биол. наук, ассистент Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Тел. +38044 5223995; e-mail: skuryachenko@gmail.com

*Парникоза Иван Юрьевич* — канд. биол. наук, науч. сотр. ИМБиГ НАНУ. Тел. +380445260798; e-mail: parnikoza@gmail.com

*Майданюк Дмитрий Николаевич* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Луганского национального университета имени Тараса Шевченко. Тел. +380642537267; e-mail: redmaidan@gmail.com

*Волков Роман Анатолиевич* — докт. биол. наук, проф., зав. каф. молекулярной генетики и биотехнологии Черновицкого национального университета имени Юрия Федьковича. Тел. +380372584793; e-mail: ra.volkov@gmail.com

*Козерецкая Ирина Анатольевна* — канд. биол. наук, доцент Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Тел. +38044 5223995; e-mail: kozeri@gmail.com

*Кунах Виктор Анатольевич* — член-корр. НАН Украины, докт. биол. наук, проф., зав. отделом ИМБиГ НАНУ. Тел. +380445260798; e-mail: kunakh@imbg.org.ua