

УДК 574  
ББК 28.081  
П 781

**Материалы конференции изданы при финансовой поддержке  
Президиума УрО РАН и Экологического фонда  
Свердловской области.**

**П 781 Проблемы глобальной и региональной экологии:** Материалы  
конф. молодых ученых, 31 марта – 4 апреля 2003 г. / ИЭРиЖ УрО РАН. —  
Екатеринбург: Изд-во «Академкнига», 2003. — 372 с.

ISBN 5-93472-080-5

В сборнике представлены материалы конференции, которая проходила 31 марта – 4 апреля в Институте экологии растений и животных УрО РАН. Работы молодых ученых посвящены изучению закономерностей организации, функционирования, динамики и устойчивости популяций и сообществ, анализу биологического разнообразия растений и животных, проблемам биомониторинга окружающей среды.

Табл. 83, Илл. 126.

ISBN 5-93472-080-5

© Коллектив авторов, 2003  
© Оформление. Издательство  
«Академкнига», 2003

## ИЗУЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ОСТРОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСТВЕННИЦ (ИТУРУП, САХАЛИН) С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЁРОВ ДНК (RAPD-МЕТОД)

Е.А. Левина, И.Ю. Адрианова

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

Ареал видов рода *Larix* охватывает северную часть североамериканского континента и почти половину территории нашей страны, где по мере продвижения на восток лиственница становится основной лесообразующей породой (Абаимов, Коропачинский, 1984). Считается, что наибольшее видовое разнообразие лиственниц сосредоточено в сибирско-дальневосточном регионе Евразии (Гончаренко, Силин, 1997).

В результате пожаров, рубок и болезней происходит разрушение ареалов лесообразующих видов. При этом теряется запас генетической изменчивости, необходимый для экологической устойчивости вида. Поэтому необходимы точные сведения о внутривидовой генетической изменчивости, на основе которых можно будет планировать более рациональное использование видов и охранные мероприятия для отдельных более ценных популяций. Помимо этого изучение изменчивости позволяет проследить генетические взаимоотношения между популяциями и прогнозировать их дальнейшее эволюционное развитие (Потенко, Великов, 1999). Прямое изучение ДНК наиболее подходит для изучения генетической вариабельности популяций и установления степени генетической близости между ними.

В настоящее время генетическую структуру ДНК исследуют с помощью различных молекулярных маркеров. В качестве меры геномной вариабельности используются белки, так как они являются продуктами экспрессии генов и могут давать информацию о структуре и состоянии соответствующих участков ДНК. Среди различных белковых маркеров широко используются аллозимы. В последние годы в изучении структуры ДНК получил распространение метод, основанный на полимеразной цепной реакции ДНК с участием произвольных праймеров (RAPD-анализ). Этот метод исследует локусы ДНК с помощью одиночных праймеров, узнающих комплементарные участки на обеих цепях ДНК. В отличие от аллозимного, он позволяет анализировать не только уникальную, но также некодирующую часть ДНК. Благодаря этому RAPD-анализ используется в ряде лабораторий для целей таксономии и характеристики генетической структуры популяций (в том числе и редких видов). На основе данных, полученных этим методом, рассчитываются генетические параметры популяций.

Цель исследования заключалась в изучении генетической изменчивости двух популяций лиственниц, произрастающих на островах Сахалин и Итуруп, с помощью RAPD-анализа. Значения основных параметров генетической изменчивости островных популяций могут свидетельствовать о влиянии островной изоляции на степень экологической стабильности этих популяций.

Настоящая публикация представляет предварительные результаты этой работы.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал для исследования был собран в 2002 г. в центральной части о. Сахалин (среднее течение р. Тымь, западный склон Восточного хребта) и на юго-восточном побережье о. Итуруп (Курильская гряда) в 1998 г. (рис. 1).

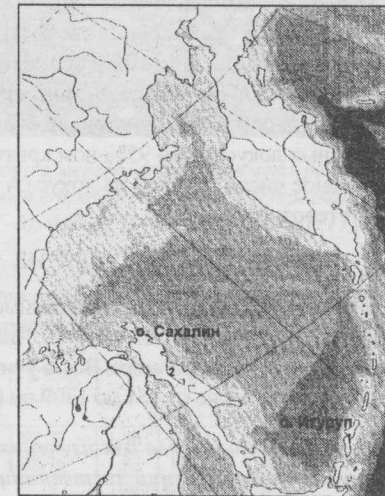


Рис. 1. Места сбора материала.

Проанализировано по 8–10 мегагаметофитов с шести деревьев итурупской и пяти деревьев сахалинской популяций.

Геномную ДНК выделяли по методике Изабель и др. (1993) с небольшими модификациями: использовали меньшие количества экстракционного буфера (310 мкл), увеличивали время инкубации до 60 минут, ацетат натрия не использовали в процедуре осаждения ДНК спиртом, но применяли при промывке ДНК 70% этанолом. Количественный анализ ДНК в пробе, а также разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,4%-ном агарозном геле. Амплификационную смесь готовили по Козыренко и др. (2001).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в термоциклере UNO II 48 («Biometra», Germany) с десятинуклеотидными праймерами произвольной последовательности («Operon Technologies Inc.», США). Использовали температурный режим: нагрев — 94° С, 2 мин., далее 45 циклов, каждый из которых состоял из трёх шагов: денатурация — 94° С, 1 мин.; отжиг — 37° С, 1 мин.; синтез — 72° С, 2 мин., последние 25 циклов продолжительность третьего шага увеличивалась на пять секунд, затем — 10 минут при 72° С и далее при 4° С.

Для определения размеров фрагментов в качестве маркера использовали PstI-рестрикты ДНК фага λ.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью сравнительного анализа полос в RAPD-спектрах исследуемых образцов с применением компьютерной программы RFLPscanPlus 3.12, при этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты (полиморфизм по интенсивности не учитывался). По каждому из праймеров были составлены бинарные матрицы, в которых наличие продуктов амплификации обозначалось «1» и отсутствие «0». Матрицы анализировали с помощью компьютерных программ POPGENE и TFPGA. Для характеристики популяций использовали следующие генетические параметры: доля полиморфных локусов при 95%-ном критерии ( $P_{95}$ ), число аллелей на locus ( $A$ ), эффективное число аллелей на locus ( $A_e$ ), средняя ожидаемая ( $H_o$ ) и наблюдаемая ( $H_e$ ) гетерозиготности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для RAPD-анализа популяций использовали три праймера из числа эффективных в ПЦР с ДНК лиственниц: ОРА-01, ОРА-03, ОРА-09. Число амплифицируемых продуктов варьировало в зависимости от праймера. Всего учитывали 29 фрагментов, размеры которых находились в диапазоне от 451 до 1307 пн (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры, используемые для изучения генетической изменчивости популяций лиственницы

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' ? 3')	Число учитываемых фрагментов
ОРА-01	CAGGCCCTTC	6
ОРА-03	AGTCAGCCAC	12
ОРА-09	GGGTAACGCC	11
Всего		29

Использование для RAPD-анализа гаплоидной ткани эндоспермов позволило наблюдать разделение аллелей полиморфных локусов, в этом состоит преимущество работы с мегагаметофитами. При работе с диплоидным материалом гетерозиготные особи неотличимы от гомозигот по доминантному аллелю, поэтому гетерозиготное состояние гена скрывается. На рис. 2 представлены амплифика-

ционные спектры ДНК 33 мегагаметофитов четырёх деревьев популяции с о. Сахалин, полученные с праймером ОРА-09. Показаны локусы, по которым дерево (I или III) является гетерозиготным.

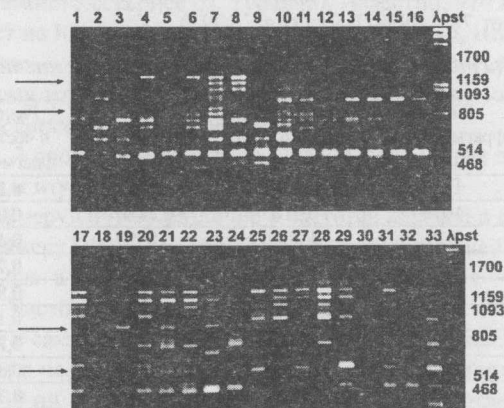


Рис. 2. RAPD-спектры мегагаметофитов четырёх деревьев лиственницы о. Сахалин, полученные с праймером ОРА-09 (стрелками указаны полиморфные локусы). Дерево I (1–8), дерево II (9–16), дерево III (17–24), дерево IV (25–33).

Таблица 2. Основные показатели генетической изменчивости популяций лиственницы островов Сахалин и Итуруп

Популяция	$P_{95}$ , %	$A$	$A_e$	$H_o$	$H_e$	Источники
RAPD-метод						
сахалинская	51,52	1,86	1,41	0,20	0,19	наши данные
итурупская	75,76	1,83	1,56	0,26	0,29	
аллозимный метод						
L.kamtschatica	50,0	1,70	--	0,16	0,17	Гончаренко Г.Г., Силин А.Ф., 1997 Semerikov V.L. et al., 1999
	73,3	1,80	--	0,16	0,16	

$P_{95}$ , % — доля полиморфных локусов,  $A$  — число аллелей на locus,  $A_e$  — эффективное число аллелей на locus,  $H_o$  — средняя наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  — средняя ожидаемая гетерозиготность.

Сравнительный анализ параметров генетической изменчивости показал, что итурупская популяция более изменчива, так как значения полиморфизма и гетерозиготности выше, чем у сахалинской (табл. 2). По нашим данным обе популя-

ции характеризуются высокими значениями генетического полиморфизма, сопоставимыми с полученными RAPD-методом для материковых популяций других видов хвойных: для *Pinus attenuata* и *P. radiata* полиморфизм не превышает пятидесяти процентов (Wu et al., 1999), для *P. mariana* это значение значительно больше и составляет 78 – 89% (Isabel et al., 1995).

Таблица 3. Частоты RAPD-фрагментов в выборках лиственницы

Праймер	Размер фрагмента, пн	Частота фрагмента		Разница в частотах фрагментов	
		сахалинская популяция	итурупская популяция		
ОРА-01	1307	0,2500	0,5185	0,27	
	1070	0,9167	0,8889	0,03	
	975	1,0000	0,8519	0,15	
	901	1,0000	0,2593	0,74	
	727	0,1389	1,0000	0,86	
ОРА-03	628	0,8889	1,0000	0,11	
	1091	0,9756	0,7368	0,25	
	1022	0,7073	0,3158	0,39	
	898	0,0244	0,7895	0,77	
	840	0,8780	0,5789	0,30	
	797	1,0000	1,0000	0,00	
	726	0,4390	0,3947	0,05	
	683	0,3415	0,2368	0,10	
	642	0,4878	0,6579	0,17	
	598	1,0000	0,7895	0,21	
	549	0,0244	1,0000	0,98	
	510	0,5854	0,5263	0,06	
	451	0,9512	0,6842	0,27	
	ОРА-09	1271	0,9744	0,8919	0,08
		1167	0,4872	0,2162	0,27
1085		0,8718	0,4595	0,41	
1004		0,7949	1,0000	0,21	
913		0,3077	0,4054	0,10	
811		0,2308	0,2432	0,01	
746		0,9231	0,4595	0,46	
680		0,6154	0,9459	0,33	
619		0,7179	0,5135	0,21	
571		0,4103	0,5676	0,16	
494		0,9744	0,8378	0,13	

Близкие значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностей для сахалинской популяции свидетельствуют о том, что эта популяция генетически стабильна и, по-видимому, не испытывает давления отбора.

Наши данные согласуются с данными аллозимного анализа, полученными для популяций *L. kamschatica* с о. Сахалин. В табл. 2 приведены основные

показатели генетической изменчивости для вида *L. kamschatica*, рассчитанные по аллозимным маркерам (Гончаренко, Силин — восточное побережье оз. Тунайча, юго-восток о. Сахалин; Семериков и др. — окрестности оз. Лебязье, что немного севернее оз. Тунайча). Известно, что вид *L. kamschatica* произрастает на Южно-Курильских островах (Итуруп, Шикотан), а также на большей части о. Сахалин, не включая его северную территорию (Бобров, 1972). Поэтому, изучаемую нами выборку на о. Сахалин можно рассматривать как *L. kamschatica*, но лишь предположительно.

В табл. 3 представлены частоты RAPD-фрагментов для представителей сахалинской и итурупской популяций.

По праймеру ОРА-09 различие в частотах аллелей в среднем составляет 0,38. По праймеру ОРА-01 разница в частотах трёх аллелей (1070, 975, 628 пн) незначительная, а по аллелям 901 и 727 пн она высокая — 0,74 и 0,86, соответственно. Частота фрагмента 1307 пн в итурупской популяции в два раза больше, чем в сахалинской. Для праймера ОРА-03 по большинству фрагментов различия в частотах варьируют от 0,05 до 0,3. Однако по двум фрагментам 898 и 549 пн различия большие — 0,77 и 0,98 соответственно. Локусы, для которых разница в частоте встречаемости достигает 95% и выше, А. Айла (1972) и Р. Левонтин (1978) предлагают считать «диагностическими», по которым таксоны различаются качественно. По нашим данным, различие в частоте встречаемости локуса 549 пн составляет 98%, что может указывать на принадлежность анализируемых популяций к разным таксонам. Однако, для окончательных выводов о видовой принадлежности изученной нами сахалинской выборки лиственницы необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, полученные нами значения полиморфизма и гетерозиготности свидетельствуют о высоком уровне генетической изменчивости исследованных популяций лиственницы с о. Сахалин и о. Итуруп, что говорит об их экологической стабильности.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Абаимов А. П., Коропачинский И. П. Лиственницы Гмелина и Каяндера. Новосибирск: Наука, 1984. 120 с.
- Бобров Е.Г. История и систематика лиственниц // XXV Комаровские чтения. Л.: Наука, 1972. 96 с.
- Гончаренко Г.Г., Силин А.Ф. К вопросу о генетической изменчивости и дифференциации лиственницы курильской (*Larix kurilensis* Mayr) и лиственницы японской (*Larix kaempferi* Sarg.) // ДАН. 1997. Т. 354. № 6. С. 835–838.
- Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Журавлев Ю.Н., Реунова Г.Д. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология. 2001. № 1. С. 19–26.

- Левонтин Р. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. 350 с.
- Потенко В. В., Великов А. В. Сохранение генетического разнообразия хвойных видов Дальнего Востока // Леса и лесобразовательный процесс на Дальнем Востоке: Материалы междунаро. конф. Владивосток. 1999. С. 206.
- Ayala F. J., Powell J.R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. P. 1094-1096.
- Isabel N., Tremblay L., Michaud M., Tremblay F. M., Bousquet J. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. // Theoretical and applied genetics. 1993. V. 86. P. 81-87.
- Isabel N., Beaulieu J., Bousquet J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce // Evolution. 1995. V. 92. P. 6369-6373.
- Semerikov V.L., Semerikov L.F., Lascoux M. Intra- and Interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. species // Heredity. 1999. V. 82. P. 193-204.
- Wu. J., Krutovskii K.V., Strauss S.H. Nuclear DNA diversity, population differentiation and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers // Genome. 1999. V. 42. P. 893-908.

**ПРОТАНДРИЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ  
ПОПУЛЯЦИЙ ГОПЛИИ ЗОЛОТИСТОЙ  
*HOPLIA AUREOLA* PALL. (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE)**

**Н.Л. Лобанова, Е.Ю. Захарова**

*Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург*

Различный образ жизни внутрипопуляционных групп животных, разная скорость полового созревания самцов и самок, неодинаковое соотношение полов на разных стадиях жизненного цикла в числе прочих являются теми экологическими механизмами, которые обеспечивают поддержание генетической гетерогенности популяции — гарантию ее существования в меняющихся условиях среды (Шварц, 1969). Давление отбора, обусловленное влиянием физических факторов окружающей среды и биотическими взаимоотношениями, формирует определенный тип жизненного цикла так, что каждый вид приобретает уникальную адаптивную комбинацию популяционных особенностей (Одум, 1986). Для жизненных циклов многих видов, чей сезон размножения сильно ограничен во времени, характерно явление протандрии, понимаемое как более раннее появление самцов по сравнению с самками. У многих насекомых, в частности у большого числа видов Lepidoptera (Wiklund et al., 1991), Coleoptera (Yasuda, Dixon, 2002), лет самцов начинается и заканчива-