

УДК 574 (061.3)

ББК 28.081

Э 40

**Конференция проводилась при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований (05-04-58023),
Министерства природных ресурсов Свердловской области,
Президиума УрО РАН.**

**Материалы конференции изданы при финансовой поддержке
Министерства природных ресурсов Свердловской области**

Э 40

Экология: от генов до экосистем: Материалы конф. молодых ученых, 25–29 апреля 2005 г. / ИЭРиЖ УрО РАН. — Екатеринбург: Изд-во «Академкнига», 2005. — 336 с.

ISBN 5-93472-096-1

В сборнике представлены материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: от генов до экосистем», которая проходила с 25 по 29 апреля 2005 г. в Институте экологии растений и животных УрО РАН и была посвящена 50-летию начала радиобиологических и биоценологических исследований на Урале и 105-летию со дня рождения Н.В. Тимофеева-Ресовского. Работы молодых ученых посвящены проблемам генетики популяций, теории эволюции и адаптации, изучения биологического разнообразия и анализа последствий антропогенного воздействия на природные экосистемы.

Табл. 79, Илл. 96.

ISBN 5-93472-096-1

© Коллектив авторов, 2005

© Оформление. Издательство
«Академкнига», 2005

Выражаем глубокую благодарность научному руководителю В.С. Безелю за ценные рекомендации и помощь в обработке данных. Работа выполнена при поддержке гранта, выполняемого по тематическому плану научно-исследовательских работ НТГСПА (задание Федерального агентства по образованию в 2005 г.).

АЛЛОЗИМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДВУХ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

О.В. Наконечная, О.Г. Корень, А.Б. Холина

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

С помощью анализа изоферментов охарактеризован уровень генетической изменчивости и внутривидовой дифференциации двух редких видов растений Дальнего Востока — кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) и остролодочника ханкайского (*Oxytropis chankaensis* Jurtz.). Низкие показатели аллозимного полиморфизма *A. manshuriensis* ($P=24,1\%$, $A=1,24$, $Ho=0,12$) близки к таковым, установленным для редких видов растений. Уровень генетического разнообразия *O. chankaensis* весьма высок для редкого вида с ограниченным ареалом ($P=37,1\%$, $A=1,95$, $Ho=0,26$). Стратегия сохранения генофонда этих видов должна обеспечить восстановление аллельного состава и генетической структуры каждой конкретной популяции.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в связи с активной хозяйственной деятельностью все больше распространенных видов растений дальневосточной флоры переходит в категорию уязвимых, редких и исчезающих. Так, природные популяции представителя одного из древнейших семейств покрытосеменных, эндемика Маньчжурского флористического района, кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.), в настоящее время сокращаются вследствие неконтролируемых сборов, связанных с высокой лекарственной ценностью этого растения. Вид занимает ограниченный фрагментированный ареал и находится на грани исчезновения, поскольку самовозобновление его популяций незначительно. Истощение популяций узколокального эндема западного побережья озера Ханка, остролодочника ханкайского (*Oxytropis chankaensis* Jurtz.), обусловлено ухудшающейся экологической обстановкой и антропогенным загрязнением местообитаний. Между тем, растение представляет лекарственную и декоративную ценность (представители рода *Oxytropis* издавна применяются в тибетской медицине (Шретер, 1975)), и его сохранение важно

не только с точки зрения сохранения биоразнообразия, но и в качестве ценного ресурса биологически-активных веществ.

Программы по сохранению и восстановлению природных ресурсов редких растений должны обеспечивать минимальную утрату генетического разнообразия этих видов, в противном случае не избежать вымирания популяций. Процессы, протекающие в популяциях (мутационный процесс, генетический дрейф, поток генов), приводят к установлению определенного резерва изменчивости — основного потенциала для адаптивных изменений, повышения приспособленности и выживания вида. Сохранение и поддержание этой генетической изменчивости является одной из важнейших задач в проектах по сохранению генофонда редких видов (Lande, 1988). Решение данной задачи включает исследование генетической структуры вида, что необходимо для выявления популяций, находящихся под угрозой исчезновения, и определения центров наибольшего генетического разнообразия как источника материала для реинтродукции.

Цель настоящей работы заключается в исследовании генетического полиморфизма и структуры популяций двух редких видов: кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) и остролодочника ханкайского (*Oxytropis chankaensis* Jurtz.) методом аллозимного анализа.

Оба вида остро нуждаются в охране. *A. manshuriensis* занесен в Красную книгу России (1988) как «исчезающий», *O. chankaensis* занесен в региональную сводку редких растений (Харкевич, Качура, 1981). *O. chankaensis* является тетраплоидом с $2n=32$ (Гурзенков, 1973); по данным анализа изоферментов установлено автотетраплоидное происхождение вида (Холина и др., 2004).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал для исследований собирали в следующих пунктах: *A. manshuriensis* — в бассейнах рек Нежинка, Ананьевка и Малая Борисовка; *O. chankaensis* — в 5 природных популяциях на западном берегу оз. Ханка: окрестности с. Турий Рог (ТР), с. Новокачалинск (НК), коса Пржевальского (КП), о. Сосновый (ОС), с. Троицкое (ТЦ). Популяции КП и ОС находятся на территории заповедника «Ханкайский». Генетическую структуру популяций изучали по общепринятым методикам с использованием в качестве маркеров полиморфных ферментных систем (Kephart, 1990; May, 1992). Экстракцию ферментов проводили из листьев растений, замороженных в жидком азоте. Генетическая интерпретация электрофоретической изменчивости исследуемых локусов основана на представлениях о субъединичной (четвертичной) структуре ферментов растений и внутриклеточной компартментации (Kephart, 1990; May, 1992).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

A. manshuriensis. Электрофоретический анализ листовой ткани 178 растений кирказона из 3 природных популяций проведен по 29 ген-ферментным системам. Ферменты выявляются на электрофореграммах с различной степенью активности. Среди них 9 ферментов выявляются стабильно (AAT, ACP, FE, GPI, GPT, ME, PGM, MDH, IDH). Анализ изоферментного состава позволяет идентифицировать 18 локусов, 5 из которых полиморфны. Всего по этим локусам выявлено 23 аллеля, которые в дальнейшем использованы в качестве маркеров генов для описания генетической структуры популяций.

Популяционно-генетический анализ выявляет невысокий уровень полиморфизма в популяциях кирказона (в среднем по популяциям доля полиморфных локусов $P=24,1\%$, число аллелей на локус $A=1,24$, что несколько ниже показателей, установленных для эндемичных и редких видов (табл.)). Средняя ожидаемая гетерозиготность *A. manshuriensis* составляет 0,10, что соответствует средней ожидаемой гетерозиготности в популяциях эндемичных и редких растений. Наблюдаемая гетерозиготность составляет в среднем 0,12. Это означает, что «средний» индивидуум кирказона гетерозиготен по 12% своих генов.

Таблица. Генетический полиморфизм в популяциях двух редких видов

| Показатели полиморфизма | | $P_{95}, \%$ | $P_{99}, \%$ | H_o | H_e | A | A_p |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|-------|-------|------|-------|
| <i>Aristolochia manshuriensis</i> | Среднее по популяциям | 24,1 | 24,4 | 0,12 | 0,10 | 1,24 | 1,88 |
| | Для вида | 27,8 | 27,8 | 0,12 | 0,11 | 1,28 | 2,00 |
| <i>Oxytropis chankaensis</i> | Среднее по популяциям | 37,1 | 42,9 | 0,261 | 0,294 | 1,95 | 3,22 |
| | Для вида | 42,9 | 42,9 | 0,266 | 0,301 | 2,00 | 3,33 |
| Эндемичные виды, 159 видов* | Среднее по популяциям | - | 29,2 | - | 0,076 | 1,43 | - |
| Редкие виды, 54 вида** | Среднее по популяциям | - | 29,9 | - | 0,095 | 1,53 | - |

Примечание: N - количество исследованных растений, $P_{95}, P_{99} \%$ — полиморфность с учетом 95 и 99%-го критерия, H_o — наблюдаемая гетерозиготность, H_e — ожидаемая гетерозиготность, A — количество аллелей на локус, A_p — количество аллелей на полиморфный локус. * По данным Godt et al., 1996; ** — Gitzendanner, Soltis, 2000.

Во всех исследованных выборках наблюдаемая гетерозиготность выше ожидаемой, за исключением субпопуляции 8 (бассейн р. Ананьевка), где наблюдаемая гетерозиготность ниже ожидаемой. Наибольший уровень генетического разнообразия выявлен в популяции бассейна р. Нежинка, наименьший — в популяции бассейна р. Ананьевка. Данная популяциями подвергается

наиболее интенсивным антропогенным воздействиям; ее численность, по сравнению с остальными популяциями, является минимальной (О.В. Наконечная, личные наблюдения). Вероятно, сокращение численности данной популяции приводит к снижению уровня изменчивости.

Генетическая структура 3 популяций *A. manshuriensis* проанализирована с использованием F -статистик Райта. Среднее значение F_{IS} по всем локусам составляет 0,1893, что указывает на 19% избыток гетерозигот в средней выборке. Показатели подразделенности были получены на уровне субпопуляций (F_{ST1}) и популяций (F_{ST2}). F_{ST1} составляет 0,1372. Это означает, что 13,7% изменчивости составляют различия между выборками. В то же время, F_{ST2} составляет всего 0,0841, что подразумевает незначительную дифференциацию трех популяций. Таким образом, изученные популяции имеют выраженную внутреннюю субпопуляционную структуру и, вероятно, в прошлом обладали сильным генофондом. Такая картина часто наблюдается в популяциях клональных видов или при наличии серьезных изоляционных барьеров между субпопуляциями. Поскольку изученные нами выборки были изолированы незначительно (и только расстоянием), можно предположить, что вегетативное размножение участвует в возобновлении популяций *A. manshuriensis* наряду с семенным и определяет внутреннюю структуру его популяций.

При анализе взаимоотношений популяций на основе генетических дистанций Нея прослеживается определенная мозаичность генетической структуры *A. manshuriensis*. Это отражается на дендрограмме (рис. 1), где не всегда проявляется отчетливое распределение популяций в зависимости от географического расположения.

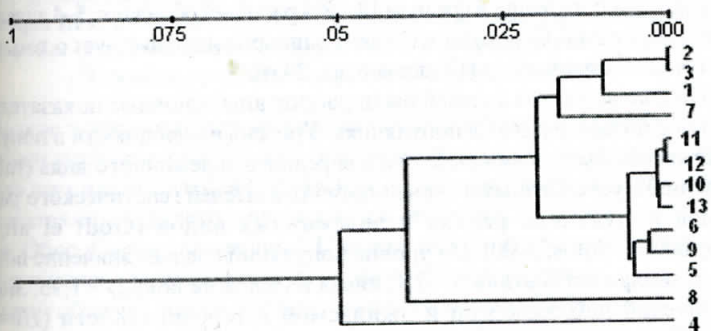


Рис. 1. UPGMA-дендрограмма генетических взаимоотношений 13 изученных выборок из 3 популяций *A. manshuriensis*, построенная на основе коэффициентов генетической дистанции Нея.

На дендрограмме выборки 1, 2, 3 популяции бассейна р. Нежинка объединены в единый кластер. Выборки бассейна р. Малая Борисовка, расположенные на склонах левого берега реки (10, 11, 12, 13), также образуют одну группу с высоким уровнем сходства, единственная выборка правого берега (9) генетически обособлена, но все выборки входят, тем не менее, в один общий кластер. В подгруппу с выборкой 9 попадают выборки двух других популяций. Обособленно выделяются выборка 4 бассейна р. Нежинка и выборка 8 (р. Ананьевка). Из-за низкой численности популяций кирказона и малого объема выборок нельзя исключить влияние ошибки выборки при кластеризации популяций.

Таким образом, реликтовые популяции *A. manshuriensis* характеризуются невысоким уровнем генетического разнообразия в пределах ареала вида на территории России. Вследствие того, что ареал *A. manshuriensis* узкий и фрагментированный, и популяции изолированы друг от друга, вероятно, существенный вклад в снижение изменчивости данного вида вносит дрейф генов, в том числе и обусловленный интенсивным антропогенным воздействием.

O. chankaensis. Электрофоретический анализ листовой ткани 294 растений из 5 природных популяций *O. chankaensis* был проведен по 16 ген-ферментным системам. Было обнаружено 56 электрофоретических вариантов по 28 зонам активности 16 ферментов и выявлен полиморфизм по 12 локусам (ACO, AAT, CE, FE — 2 локуса, GPI, GPT, IDH, LAP, MDH — 3 локуса). По всем полиморфным локусам на фореграммах выявлено наличие сбалансированных и несбалансированных гетерозигот во всех возможных сочетаниях, т. е. наблюдается изменчивость по дозе гена, указывающая на тетрасомное наследование. Для каждого локуса с 3–5 аллелимами обнаружены гетерозиготные варианты, выявляющие одновременное присутствие трех или четырех аллелей по отдельному локусу, при этом в каждой популяции в среднем 14–18% растений обладают 3–4 аллелями по отдельному локусу. Совокупность таких данных свидетельствует о том, что вид является автотетраплоидом (Холина и др., 2004).

На основе частот аллелей были рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма в популяциях. Уровень изменчивости в популяциях *O. chankaensis* был весьма высоким для редкого эндемичного вида (табл.), по сравнению с усредненными значениями показателей генетического разнообразия в популяциях редких и эндемичных видов (Godt et al., 1996; Gitzendanner, Soltis, 2000). На уровне популяций среднее значение показателя полиморфизма составило 37,1, числа аллелей на локус — 1,95. Значения показателей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности ($H_o=0,261$; $H_e=0,294$) оказались намного выше средних значений, установленных для редких и эндемичных видов. Высокие значения показателей полиморфизма в популяциях *O. chankaensis* могут быть обусловлены тетрасомным типом наследования, характерным для автотетраплоидных видов. Автотетраплоиды, в

целом, отличаются повышенным уровнем изменчивости, наличием большего числа полиморфных локусов, количества аллелей на локус, более высокими показателями гетерозиготности, по сравнению с их диплоидными предшественниками (Ness et al., 1989; Soltis, Soltis, 1989). Кроме того, определенный вклад в поддержание наблюдаемого уровня полиморфизма вносит и система размножения вида — перекрестное оплодотворение с помощью насекомых и наличие самонесовместимости, а также особенности биологии: жизненная форма — многолетнее растение, длительный репродуктивный период при значительной продолжительности жизни особи, ранний переход в генеративное состояние, высокая семенная продуктивность (Холина и др., 2003).

Анализ подразделенности популяций с использованием F -статистики Райта показал, что 97,5% всей изменчивости находится внутри популяций и только 2,9% приходится на межпопуляционную изменчивость, т. е. каждая отдельная популяция остролодочника поддерживает до 97% генетической изменчивости вида. Величина потока генов, рассчитанная на основе значения коэффициента F_{ST} , составила 9,75. Поток генов между популяциями остролодочника достаточно велик, чтобы не позволять накапливаться генным различиям.

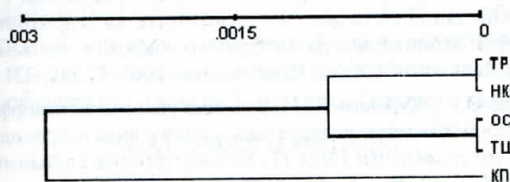


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе коэффициентов генетической дистанции Нея, показывающая степень генетической дифференциации между популяциями *O. chankaensis*. ТР — Турый Рог, НК — Новокачалик, КП — коса Пржевальского, ОС — о. Сосновый, ТЦ — Троицкое.

Низкие значения генетических дистанций (в среднем $D_N=0,009$) между выборками указывают на близкое генетическое родство популяций (рис. 2). Сходство двух пар популяций (ТР-НК и ОС-ТЦ) может быть связано с тем, что они расположены недалеко друг от друга и, вероятно, обладают общим генофондом. Обособление популяции КП можно объяснить более высоким уровнем генетического разнообразия на охраняемой территории.

Таким образом, для *O. chankaensis* установлен высокий уровень аллозимного полиморфизма при низкой генетической дифференциации популяций. Значения показателей изменчивости в популяциях довольно сходны. Тем не менее, несмотря на слабую дивергенцию популяций, каждая из них обладает уникальным аллельным составом.

В результате исследования охарактеризован уровень генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации двух редких видов растений Дальнего Востока — *A. manshuriensis* и *O. chankaensis*. Стратегия сохранения генофонда редких видов предполагает восстановление аллельного состава и генетической структуры каждой конкретной популяции как устойчивой системы локальных адаптаций. С учетом этого, а также принимая во внимание низкую численность существующих популяций *A. manshuriensis* и *O. chankaensis*, необходимо сохранение местообитаний данных видов, поддержание и восстановление каждой популяции и мобилизация генофонда каждой из них в виде представительной коллекции семян.

ЛИТЕРАТУРА

- Гурзенков Н.Н. Исследование хромосомных чисел растений юга Дальнего Востока // Комаровские чтения. Владивосток: БПИ ДВНЦ АН СССР. 1973. Вып. 20. С. 47–62.
- Красная книга РСФСР. Растения. М.: Росагропромиздат, 1988. 590 с.
- Харкевич С.С., Качура Н.Н. Редкие виды растений советского Дальнего Востока и их охрана. М.: Наука, 1981. 234 с.
- Холина А.Б., Корень О.Г., Маркелова (Наконечная) О.Б., Безделева Т.А., Холин С.К. Состояние популяций *Oxytropis chankaensis* Jurtz. на территории заповедника «Ханкайский» // Мониторинг растительного покрова охраняемых территорий российского Дальнего Востока. Владивосток, 2003. С. 212–221.
- Холина А.Б., Корень О.Г., Журавлев Ю.Н. Высокий уровень полиморфизма и автотетраплоидное происхождение редкого эндемичного вида остролодочника ханкайского *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae): данные аллозимного анализа // Генетика. 2004. Т. 40. № 4. С. 497–505.
- Шретер А.И. Лекарственная флора советского Дальнего Востока. М.: Медицина, 1975. 328 с.
- Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Pattern of genetic variation in rare and widespread plant congeners // Amer. J. Bot. 2000. V. 87. P. 783–792.
- Godt M.J.W., Johnson B.R., Hamrick J.L. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species // Conservation Biology. 1996. V. 10. P. 796–805.
- Kephart S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques // Amer. J. Bot. 1990. V. 77. P. 693–712.
- Lande R. Genetics and demography in biological conservation // Science. 1988. V. 241. P. 1455–1460.
- May B. Starch gel electrophoresis of allozymes // Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach / Ed. Hoelzel A.R. London: Oxford Univ. Press, 1992. P. 1–27 and 271–280.
- Ness B.D., Soltis D.E., Soltis P.S. Autopolyploidy in *Heuchera micrantha* (Saxifragaceae) // Amer. J. Bot. 1989. V. 76. P. 614–626.
- Soltis D.E., Soltis P.S. Genetic consequences of autopolyploidy in *Tolmiea* (Saxifragaceae) // Evolution. 1989. V. 43. P. 586–594.