РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ПРОГРАММА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕЗИДИУМА РАН

«БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ»

ПОДПРОГРАММА
«ГЕНОФОНДЫ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ»

Сборник материалов

Москва

2011

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФЛОРЫ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Журавлёв Ю.Н., Реунова Г.Д., Корень О.Г., Музарок Т.И., Холина А.Б., Наконечная О.В., Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Адрианова И.Ю., Васюткина Е.А., Кац И.Л.

Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток

На основе AFLP маркёров, полученных на генетическом анализаторе, выполнено популяционно-генетическое исследование 10 популяций женьшеня настоящего *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae), природные запасы которого истощены и нуждаются в восстановлении. Выявлены высокие показатели генетической изменчивости в субпопуляциях и для вида. Уровень полиморфизма для субпопуляций составил 55.68%, а для суммарной выборки – 99.65%. Общая гетерозиготность, рассчитанная на основе подхода Байеса, составила 0.2857. AMOVA и подход Байеса показали значимую дифференциацию субпопуляций женьшеня (FST = 0.36; θB = 0.36). Генетическое структурирование *P. ginseng* подтверждено точным тестом на дифференциацию субпопуляций. Тест на изоляцию показал отсутствие корреляции между генетической дифференциацией и географическими расстояниями между субпопуляциями (r = -0.174; P = 0.817). Полученные результаты свидетельствуют о "классической" модели метапопуляционной структуры вида. Анализ генетических взаимоотношений (UPGMA, PCoA, MST) выявил две демографически независимые дивергентные группы субпопуляций (рис.1), которые необходимо рассматривать как "менеджмент единицы" (MUs). Установлено, что расселение женьшеня по Приморскому краю могло идти в двух направлениях: с юга, через надеждинскую субпопуляцию, и с запада, через спасскую субпопуляцию (рис. 2).

Методами аллозимного, RAPD и ISSR анализов исследована генетическая и генотипическая изменчивость редкого реликтового вида, представителя одного из древних семейств покрытосеменных – Аралиевые (Araliaceae), клонообразующего растения заманихи высокой *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai. Показатели аллозимной изменчивости имеют невысокие значе-

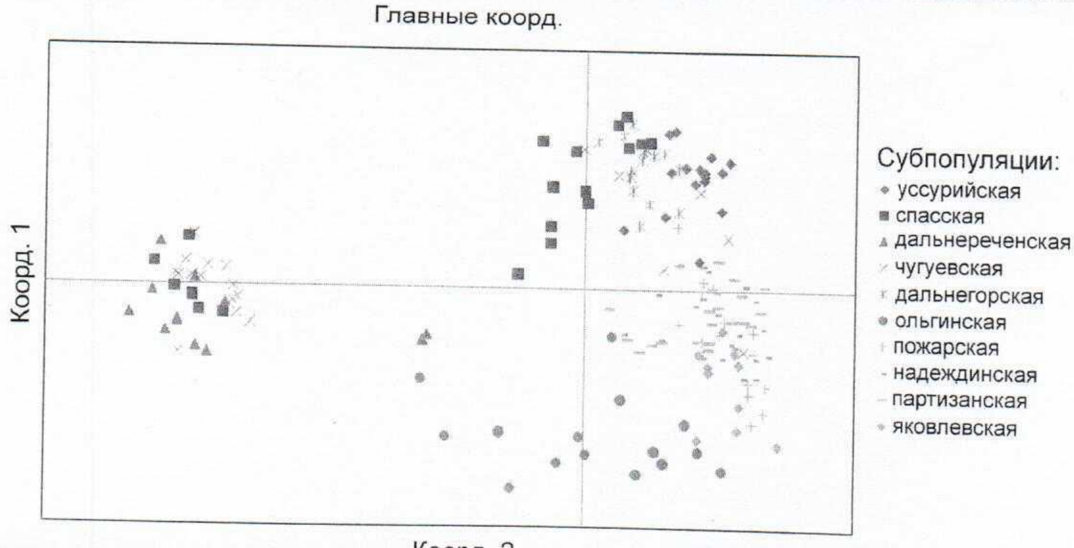


Рисунок 1. **Анализ главных координат (PCoA) представителей Panax ginseng, основанный на AFLP-маркерах.**

ния (P = 25.0%, A = 1.45, H_o = 0.131, H_e = 0.113), сопоставимые с данными, известными для редких видов растений и представителей сем. Araliaceae. Основными факторами, ответственными за наблюдаемый уровень полиморфизма, вероятно, являются эволюционная история вида и дрейф генов. В то же время уровень генотипического разнообразия (G/N = 0.76,

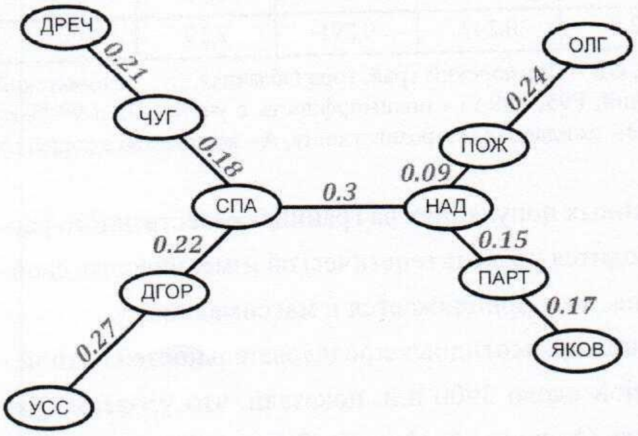


Рисунок 2. **Минимальное спеннинг-дерево (MST), представляющее генетические связи между субпопуляциями Panax ginseng, изученными на основе AFLP-маркеров. УСС, ДГОР, СПА, ЧУГ, ДРЕЧ, НАД, ПОЖ, ОЛГ, ПАРТ, ЯКОВ – уссурийская, дальнегорская, спасская, чугуевская, дальнереченская, надеждинская, пожарская, ольгинская, партизанская, яковслевская субпопуляции, соответственно. Цифры показывают генетические дистанции между субпопуляциями.**

D = 0.97) существенно превышает величины, известные для видов с вегетативным размножением (D = 0.62), что указывает на определенный вклад семенного размножения в его формирование. По результатам AMOVA около 30% RAPD и ISSR изменчивости составила межпопуляционная компонента. Генетические связи популяций изучены методами многомерного шкалирования, UPGMA и построением минимального спеннинг дерева (MST). Топология MS дерева свидетельствует о том, что Хасанская популяция могла быть предковой по отношению к другим популяциям при расселении заманихи по территории Приморского края в период потепления климата (рис. 3).

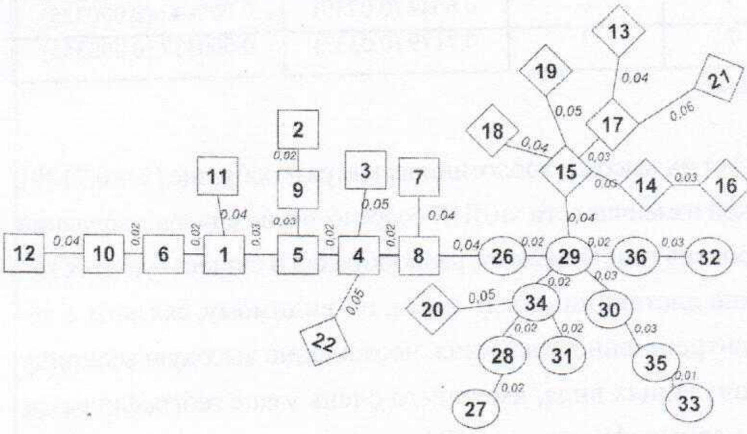


Рисунок 3. **MS-дерево генетических связей представителей Oplopanax elatus, полученных с участием RAPD+ISSR маркеров. Растения из чугуевской популяции отмечены квадратами, шкотовской – ромбами, хасанской – кружками. Цифры на линиях указывают генетические дистанции между представителями.**

На основе анализа изоферментов охарактеризована генетическая изменчивость кедрового стланика *Pinus pumila* (Pall.) Regel в трех краевых популяциях юго-западной, южной и восточной частей ареала (Прибайкалье, Приморье, Камчатка). Анализ проведен по 16 изоферментным локусам, кодирующим 10 ферментных систем (табл. 1). Полученные данные подтверждают, что *P. pumila* является одним из самых полиморфных видов, входящих в род *Pinus*. Три краевые популяции отличаются высокой генетической изменчивостью (P_{95} = 68.8%, H_o = 0.247, H_e = 0.291). Гетерогенность популяций и достаточно высокий для хвойных уровень дивергенции популяций (F_{ST} = 0.050, D_N = 0.044) отражают их генетическое свое-

Таблица 1. **Основные показатели генетического полиморфизма *Pinus pumila***

Популяции	N	P_{95}, %	P_{99}, %	H_o	H_e	A	n_e
БК	28	81.3	81.3	0.275	0.32	2.19	1.47
ОБ	22	68.8	75	0.227	0.284	2.06	1.4
ЭС	25	56.3	62.5	0.24	0.267	2.31	1.36
Среднее		68.8	72.9	0.247	0.291	2.19	1.41

Примечание: БК – оз. Байкал, п-ов Святой Нос, ОБ – Приморский край, гора Облачная, ЭС – Камчатский край, с. Эссо. N – число исследованных растений, P95, P99,% - полиморфность с учетом 95 и 99 %-го критерия, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, A – количество аллелей на локус, ne – эффективное число аллелей.

образие. Можно заключить, что в исследованных популяциях на границах естественного распространения *P. pumila* не только воспроизводится уровень генетической изменчивости, свойственный этому виду в других частях ареала, но и приближается к максимальному.

Данные ПДРФ–анализа и секвенирования нуклеотидных последовательностей пяти некодирующих регионов хпДНК общей длиной около 3900 п.н. показали, что уровень нуклеотидной изменчивости хпДНК в популяциях *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae) очень невысок ($\pi = 0.000517$) (табл. 2). Однако распределение семи гаплотипов в оставшихся природных по-

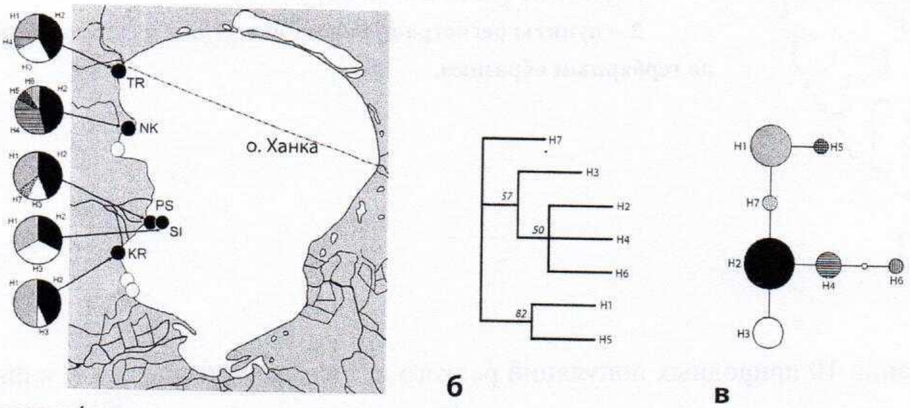
Таблица 2. **Генетическая изменчивость популяций *Oxytropis chankaensis* по данным анализа хп ДНК**

Популяция	Кол-во полиморфных сайтов	Кол-во гаплотипов	Кол-во уникальных гаплотипов	Гаплотипическое разнообразие (СО)	Нуклеотидное разнообразие (СО)
Турий рог	4	4	0	0.7576 (0.0806)	0.000505 (0.000375)
Новокачалинск	4	4	2	0.7091 (0.0990)	0.000461 (0.000353)
Коса Пржевальского	3	4	1	0.7143 (0.0787)	0.000466 (0.000349)
остров Сосновый	3	3	0	0.7273 (0.0580)	0.000527 (0.000387)
Троицкое	3	3	0	0.6044 (0.0759)	0.000442 (0.000335)
Всего	5	7	3	0.7179 (0.0333)	0.000517 (0.000355)

Примечание: СО - стандартное отклонение.

пуляциях остролодочника обуславливает их высокое гаплотипическое разнообразие ($h = 0.7179$), при этом около 90% общей генетической изменчивости хпДНК сосредоточено внутри популяций ($\Phi_{ST} = 0.090$, P = 0,027). Сходный уровень генетического разнообразия в существующих популяциях, и незначимые генетические дистанции между ними, по-видимому, связаны с недавним их разделением в результате антропогенного влияния. неожиданно высокую величину гаплотипического разнообразия в популяциях вида, имеющего очень узкое географическое распространение, можно объяснить полиморфизмом хпДНК в популяциях предкового вида, занимавшего более обширный ареал, и/или неоднократным возникновением полиплоидов из генетически неоднородных индивидуумов предкового диплоидного вида (рис. 4).

Методом маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR-анализ) изучены генетическая изменчивость и дифференциация одиннадцати природных популяций *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) из разных частей ареала. Уровень генетического разнообразия отдельных популяций относительно невысокий (*P* 30.6-59.1%, *H* 0.088-0.165, *SI* 0.137-0.257), однако в целом, *R. rosea* обладает высокой изменчивостью генома: *P* = 96.4%, *H* = 0.176, *SI* = 0.291, что характерно для перекрестноопыляемых видов растений. На межпопуляционную изменчивость приходится 32.5% от общего объема генетического разнообразия, а на внутрипопуляционную – 67.5%. Такая генетическая структура является результатом слабого генного потока вследствие изолированности популяций. Кластерный анализ методом UPGMA показал, что генетическая дифференциация популяций R. rosea не коррелирует с их геогра-



а б в

Рисунок 4.
а) Географической положение популяций *Oxitopis chankaensis* и распределение в них гаплотипов хлДНК;
б) Филогенетическое древо гаплотипов хлДНК (цифрами указаны значения индекса бутстрепа, %);
в) Филогенетическая сеть гаплотипов хлДНК.

фическим распространением. Две группы популяций R. rosea представляют, вероятно, две рано дивергировавшие эволюционные линии, каждая из которых имеет свою эволюционную историю и миграционные пути.

Продолжены исследования популяционной изменчивости видов *Rhodiola rosea, R. pinnatifida, R. stephanii* и *R. integrifolia* с помощью анализа нуклеотидных последовательностей *atpB-rpcL* и *trnS-trnG* регионов хпДНК. Для 98 образцов получены нуклеотидные последовательности *trnS-trnG* региона, длина которого составила 702 пн. Выявлен 21 гаплотип, из них восемь уникальны и все выявлены у *R. rosea*. Общая длина, включая индели, объединенных вместе последовательностей *atpB-rpcL* и *trnS-trnG* регионов, для каждого образца составила 1479 пн. Изменчивость этих регионов, составляющих около 1% пластидного генома, достаточно высокая. Обнаружено 50 вариабельных сайтов, из них 44 были информативны согласно методу максимальной экономии и 6 – неинформативны. Анализ 95 последовательностей четырех видов (*R. rosea, R. pinnatifida, R. stephanii* и *R. integrifolia*) выявил 30 гаплотипов, из них 13 уникальны. Двенадцать уникальных гаплотипов выявлены у *R. rosea*. По одному гаплотипу в популяции обнаружено у *R. stephanii* (Бурятия), у *R. integrifolia* (Камчатка) и R. rosea (Камчатка). В хабаровской популяции *R. stephanii* выявлено два гаплотипа, а у *R. pinnatifida* (Бурятия) – 4. Наибольшим гаплотипическим разнообразием характеризуется польская популяция *R. rosea* – 9 гаплотипов. Филогенетический анализ показал, что таксоны распределены в два кластера: в одном с высокой статистической поддержкой (BI 99%) объединились образцы видов *R. stephanii* и *R. integrifolia*, в другом (без поддержки) – *R. rosea* и *R. pinnatifida*. В последнем можно выделить две группы, образованные представителями *R. pinnatifida* (BI 63%) и *R. rosea* (Камчатка, BI 87%). Данные, полученные на основе анализа нуклеотидных последовательностей *atpB-rpcL* и *trnS-trnG* регионов хпДНК, совпадают с результатами ISSR-анализа. Вероятно, популяция из Бурятии, растения которой были определены как *R. pinnatifida*, является самостоятельным внутривидовым таксоном – экотипом (климатипом) *R. rosea*.

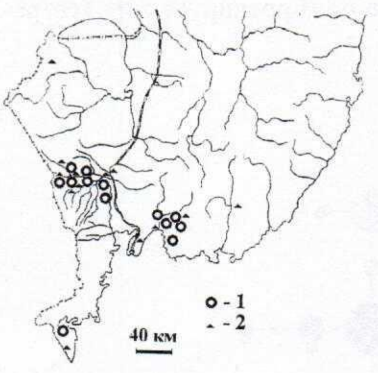


***Рисунок 5*. Распространение *Aristolochia contorta* в Приморье.**

1–обследованные локальности;

2 – пункты регистрации вида, известные из литературы и по гербарным образцам.

При обследовании 10 природных популяций редкого лекарственного растения кирказона скрученного *Aristolochia contorta* на территории Приморского края установлено, что в настоящее время вид сохранился в местообитаниях, в которых был отмечен в начале прошлого века (рис. 5). Выявлена эколого-ценотическая приуроченность *A. contorta*. Установлено, что природные популяции представлены небольшими изолированными поселениями, которые насчитывают от 10 до 100 растений. В сообществах с участием *A. contorta* насчитывается от 20 до 50 видов сосудистых растений, разнообразие которых определяется спецификой местообитания, а также интенсивностью антропогенного воздействия. Очевидно, что строгая привязанность *A. contorta* к определенным экологическим и фитоценотическим условиям свидетельствует о невозможности его сохранения в Приморье без охраны отдельных местообитаний.

Выполнено кариологическое исследование лиственниц из ареала *Larix olgensis* A. Henry в Приморском крае, изучена фенотипическая изменчивость генеративных органов лиственниц, произрастающих в Приморье, Амурской области, ЕАО, на п-ове Камчатка, островах Сахалин, Итуруп и Шикотан.