

АЛЛОЗИМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДВУХ ВОЗРАСТНЫХ СОСТОЯНИЙ КИРКАЗОНА МАНЬЧЖУРСКОГО (*ARISTOLOCHIA MANSHURIENSIS*) В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

В статье рассматриваются вопросы сохранения кирказона маньчжурского в природных популяциях. Выявлены различия параметров аллозимной изменчивости в двух возрастных группах *Aristolochia manshuriensis*, которые позволяют предположить действие отбора на разных стадиях онтогенеза.

Ключевые слова: *Aristolochia manshuriensis*, возрастная изменчивость, природные популяции, Приморский край.

O.V. Nakonechnaya, O.G. Koren

ALLOZYME VARIABILITY OF THE MANCHURIAN BIRTHWORT (*ARISTOLOCHIA MANSHURIENSIS*) TWO AGE CONDITIONS IN THE NATURAL POPULATIONS

The issues of Manchurian birthwort preservation in the natural populations are considered in the article. Allozyme variability parameter differences in two age groups of *Aristolochia manshuriensis* which allow to consider selection activity in different ontogenesis stages are revealed.

Key words: *Aristolochia manshuriensis*, age variability, natural populations, Primorskii krai.

Кирказон маньчжурский (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) – уникальная реликтовая лиана, эндемик Маньчжурского флористического района [1]. В России произрастает только на юго-западе Приморского края, где достигает северной границы ареала [2–3]. Его популяции фрагментированы, их численность постепенно сокращается [4] несмотря на то, что *A. manshuriensis* занесен в Красную книгу РСФСР [5] и Красную книгу Приморского края [3]. Для сохранения природных популяций этого реликтового вида необходимо исследовать биологические основы его выживания, в том числе понять популяционно-генетические процессы, происходящие на границах ареала вида. Ранее мы детально изучили анатомическое строение андрогцея и гинецея, особенности репродуктивной биологии [6–8], описали популяционно-генетическую структуру вида [9] и определили влияние основных микроэволюционных факторов, таких, как генетический дрейф и поток генов на уровень генетического разнообразия природных популяций *A. manshuriensis* [4]. Было показано, что приспособленность к опылению насекомыми при отсутствии конкретных видов опылителей повлечет за собой снижение семенного возобновления популяций, а фрагментация ареала – к преимущественному скрещиванию внутри малых групп, что неизбежно ведет к накоплению сегрегационного генетического груза. В пользу этого свидетельствует достаточно высокая наблюдаемая гетерозиготность при низком аллельном разнообразии. Действительно, при небольшом эффективном размере популяций инбридинг должен был неизбежно привести к уменьшению гетерозиготности и фиксации аллелей. Однако этого не происходит. Данный факт свидетельствует либо об отборе в пользу гетерозигот, либо об элиминации гомозигот вследствие выщепления полуплетальных и летальных мутаций. Кроме этого, было отмечено, что популяции представлены в основном особями, много лет находящимися в виргинильном состоянии (популяции, приуроченные к бассейнам рек Нежинка и Ананьевка) и только в двух популяциях (Малая Борисовка и Малая Ананьевка) отмечены растения в средневозрастном генеративном состоянии. В связи с этим особенно важно выявить, как изменяются показатели полиморфизма в разных возрастных состояниях; определить, существуют ли векторы отбора в пользу определенных генотипов. Это, возможно, поможет понять, почему растения не переходят в следующее онтогенетическое состояние своего развития.

Цель исследований. Определить параметры генетической изменчивости особей *A. manshuriensis*, находящихся в двух возрастных состояниях – виргинильные и средневозрастные генеративные – методом аллозимного анализа.

Материалы и методы исследований. Сбор материала проводился в 2002–2007 гг. в двух природных популяциях Приморского края, приуроченных к бассейнам рек Малая Борисовка и Малая Ананьевка. Для исследований отбирали растения двух возрастных состояний: группу виргинильных составляли плагиотропные растения 1 м длиной; группа средневозрастных генеративных представлена цветущими и плодоносящими лианами 15–20 м длиной с диаметром стебля около 10 см. Выделение периодов и состояний онтогенетического развития приведено при использовании классификации Т.А. Работнова [10] с некоторыми до-

полнениями и изменениями [11]. Для электрофоретического анализа использовались листья растений, которые были заморожены и хранились в жидком азоте до проведения анализа. Всего исследовано 72 растения (54 особи в виргинильном состоянии и 18 особей в средневозрастном генеративном состоянии).

Электрофоретическое фракционирование ферментных белков проводили в 13 % крахмальном геле в трех буферных системах – трис-цитратной (pH = 6.2), трис-цитратной (pH = 7.8) и трис-ЭДТА-боратной (pH = 8.6) [9]. В данной работе использовались пять полиморфных локусов, описанных нами ранее: *Gpt* (глутаматпируваттрансаминаза, К.Ф. 2.6.1.2), *Gpi-2* (глюкозофосфатизомераза, К.Ф. 5.3.1.9), *Acp-2* (кислая фосфатаза, К.Ф. 3.1.3.2), *Fe-2* (флюоресцентная эстераза, К.Ф. 3.1.1.2), *Pgm* (фосфоглюкомутаза, К.Ф. 2.7.5.1).

Показатели полиморфизма рассчитывали общепринятыми методами [12]. Статистическую обработку проводили с использованием программы TFPGA [13]. Генотипическое разнообразие оценивали как соотношение G/N, где G – количество различных генотипов, N – размер выборки [14], а также с помощью модифицированного индекса разнообразия Симпсона (D), используемого для клональных растений [14–15]: $D = 1 / \{[\sum n_i(n_i - 1)] / [N(N - 1)]\}$, где n_i – число растений с анализируемым фенотипом i и N – число растений анализируемых рамет.

Результаты исследований и их обсуждение. Определены частоты аллелей (табл. 1) и основные параметры генетической изменчивости особей *A. manshuriensis* в двух возрастных группах (табл. 2).

Результаты анализа показывают, что у средневозрастных генеративных растений аллель *Acp-2*^{1.00} встречается чаще, чем в группе виргинильных особей. Он найден в гомозиготном состоянии у 5 особей из 18 в первой группе и у 3 из 54 – во второй; его частота составляет соответственно 0,6389 и 0,5185 (табл. 1). Аллель *Gpi-2*^{0.65} у взрослых особей отсутствует, в то время как у молодых он встречается в популяции с частотой примерно 2 %. По локусу *Pgm* наблюдается смена преобладающего аллеля в группах. Можно заключить, что большая вероятность перейти в генеративное состояние у особей, в генотипах которых будут присутствовать аллели *Acp-2*^{1.00}, *Gpi-2*^{1.00}, *Pgm*^{1.00}.

Таблица 1

Частоты аллелей 5 полиморфных локусов в двух возрастных группах *Aristolochia manshuriensis*

Локус	Аллели	Возрастное состояние	
		Виргинильные	Средневозрастные генеративные
<i>Acp-2</i>	0,60	0,4815	0,3611
	1,00	0,5185	0,6389
<i>Gpi-2</i>	0,65	0,0185	0,0000
	1,00	0,9815	1,0000
<i>Gpt</i>	0,80	0,0648	0,1111
	1,00	0,9352	0,8889
<i>Fe-2</i>	1,15	0,3333	0,3889
	1,00	0,6667	0,6111
<i>Pgm</i>	1,20	0,5463	0,4722
	1,00	0,4537	0,5278

Таблица 2

Основные показатели генетического полиморфизма

Состояние	N	P ₉₅ , %	P ₉₉ , %	H ₀	H _E	A	N _E
Виргинильные	54	22,22	27,78	0,109	0,089	1,27	1,1
Средневозрастные генеративные	18	22,22	22,22	0,117	0,093	1,22	1,1

Примечание. N – число исследованных растений; P₉₅, P₉₉, % – полиморфность с учетом 95 и 99 %-го критерия; H₀ – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; A – количество аллелей на локус; n_E – эффективное число аллелей.

При анализе показателей генетического полиморфизма выявлено, что характеристики в исследуемых группах отличаются незначительно. Преобладание наблюдаемой гетозиготности над ожидаемой в двух ис-

следуемых группах свидетельствует об избытке гетерозигот в каждой группе. Между тем гетерозиготность (H_o и H_e) в группе средневозрастных особей выше при более низких остальных показателях, чем в группе молодых представителей *A. manshuriensis*. Для хвойных преобладание наблюдаемой аллозимной гетерозиготности в группе взрослых деревьев над таковой у зародышей семян является типичным [16]. Авторы объясняют увеличение гетерозиготности в ходе онтогенеза элиминацией инбредного потомства и балансирующим отбором в пользу гетерозигот, а также ассоциативным сверхдоминированием (эффект влияния гетеротического локуса на сцепленные с ним нейтральные). В популяциях *A. manshuriensis* увеличение гетерозиготности в средневозрастной группе сопровождается снижением показателей полиморфности по 99 % критерию (P_{99}) и количества аллелей на локус (A) (табл. 2). То есть снижение уровня полиморфизма с возрастом происходит за счет выщепления, прежде всего, редких аллелей, тогда как нередкие аллели поддерживаются в популяции в гетерозиготном состоянии. Возможно гомозиготы и редкие аллели маркируют менее приспособленные генотипы, которые элиминируются в ходе онтогенеза, либо непосредственно подвержены отбору в краевых популяциях *A. manshuriensis*. В обоих случаях такая динамика изменения показателей изменчивости позволяет предположить действие, прежде всего, балансирующего отбора, отсекающего крайние формы и направленного на поддержание определенного соотношения частот аллелей в популяциях.

Поскольку для *A. manshuriensis* предполагается вегетативное размножение [1], мы исследовали генотипическое (клональное) разнообразие вида. Индекс разнообразия Симпсона (D) был высоким в двух исследуемых возрастных группах (табл. 3), учитывая средний показатель для клонообразующих растений ($D = 0,62$ [15]). Высокий уровень генотипического разнообразия в группе средневозрастных генеративных особей ($G/N = 0,61$) при низком числе особей на клон ($N/G = 1,64$) определенно отражает события семенного заселения территории, с которой и была взята объединенная выборка. В то же время в группе виргинильных растений генотипические показатели ниже приведенных для взрослой группы растений. Более низкий уровень генотипического разнообразия в виргинильной группе показывает, что только 33 % особей имеют разные генотипы, т.е. у остальных особей генотипы повторяются. Уменьшение доли растений, имеющих клоновое происхождение, в средневозрастной группе может быть связано с тем, что в пределах клона существует внутренняя конкуренция за питательные ресурсы, и во взрослое состояние способна перейти только часть особей клона, возможно, за счет гибели остальных.

Число уникальных генотипов в группе виргинильных растений оказалось значительно выше, чем в средневозрастной группе, в которой только 2 генотипа могут считаться уникальными (табл. 3). Эти данные согласуются с более низкими показателями P_{99} и A (табл. 2) и также свидетельствуют в пользу балансирующего отбора, отсекающего редкие "нетипичные" генотипы. То есть уникальные генотипы, вероятно, являются менее приспособленными в жестких условиях краевых популяций.

При детальном сравнении генотипов в каждой возрастной группе оказалось, что 42 из 54 растений из первой группы обладают теми же генотипами, что и 15 из 18 особей из второй, т.е. примерно 78 % особей из виргинильной группы, по данным аллозимного анализа, потенциально способны перейти в следующие онтогенетические состояния.

Таблица 3

Генотипическое разнообразие особей *Aristolochia manshuriensis*, находящихся в двух возрастных состояниях

Состояние	N	G	G/N	N/G	D	Число уникальных генотипов, %
Виргинильные	54	18	0,33	3	0,86	9 у 12 особей (16,67)
Средневозрастные генеративные	18	11	0,61	1,64	0,90	2 у 3 особей (11,11)

Примечание. N – размер выборки; G – число различных генотипов; G/N – генотипическое разнообразие; N/G – число растений на клон; D – индекс разнообразия Симпсона.

При помощи индекса фиксации Райта (F_{IS}) мы оценили уровни инбридинга в двух возрастных группах. F_{IS} для выборок был одинаковым и составил -0,232. Это указывает на отсутствие инбридинга в исследованных группах, что согласуется с превышением уровня наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой в обеих группах (табл. 2). Отсутствие инбридинга также было показано ранее для всех природных популяций *A. manshuriensis* [4]. Очевидно, что приспособленность к перекрестному опылению позволяет виду поддер-

живать определенный уровень изменчивости даже в условиях малой численности генеративных особей. В то же время нельзя исключить действия отбора против гомозигот на всех стадиях онтогенеза, начиная с самых ранних.

Отсутствие инбридинга, средний уровень полиморфизма и высокий уровень генотипического разнообразия в группе средневозрастных растений показывают, что составляющие ее особи имеют семенное происхождение и, вероятно, обладают наиболее адаптированными к настоящим условиям произрастания генотипами. Анализируя те же параметры в группе виргинильных особей, можно сказать, что эта группа состоит из особей, только 1/3 из которых имеет семенное происхождение, остальные 2/3 появились, вероятнее всего, в результате вегетативного размножения или являются непосредственно частями нескольких растений, как было отмечено ранее [17].

Таким образом, в средневозрастной генеративной группе наблюдается снижение аллельного разнообразия по сравнению с группой виргинильных особей. В то же время в этой группе выявлен более высокий уровень наблюдаемой гетерозиготности и генотипического разнообразия. Эти данные позволяют предположить действие балансирующего отбора, давление которого усиливается в популяциях на границе ареала. Балансирующий отбор в данном случае может быть единственным процессом, противостоящим действию генетического дрейфа в условиях малых фрагментированных популяций с ограниченным потоком генов. Однако элиминация отбором редких аллелей и уникальных генотипов из репродуктивной выборки популяции в конечном счете приводит к усилению влияния генетического дрейфа в следующем поколении. Возможно, что такая форма отбора связана с накоплением генетического сегрегационного груза в малых изолированных популяциях *A. manshuriensis*. В этом случае уникальные генотипы и редкие аллели могут обладать пониженной приспособленностью или даже маркировать накопление летальных или полублетальных аллелей. Чтобы понять, как действует отбор на ранних стадиях онтогенеза *A. manshuriensis*, и выявить наличие генетического груза в природных популяциях, необходимы дальнейшие исследования, в том числе анализ генетического разнообразия и жизнеспособности семян и проростков из этих популяций.

Авторы выражают свою глубокую благодарность доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику лаборатории орнитологии БПИ ДВО РАН Виталию Андреевичу Нечаеву за помощь в сборе материала. Работа поддержана Программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология", проект 09-1-П22-03 "Биотехнология и молекулярная биология клеточных культур дальневосточных лекарственных растений"; программой Президиума РАН "Биологическое разнообразие", проект "Генетическое разнообразие природных популяций представителей флоры Дальнего Востока" (№ 09-1-П23-06); грантом РФФИ, проект 11-04-01388-а "Изучение генетической изменчивости природных популяций *Panax ginseng* С.А. Меуер для разработки стратегий их сохранения"; грантом ДВО РАН, проект 11-III-B-06-094 "Эволюционный стазис: векторы отбора у реликтовых растений – *Aristolochia contorta* и *A. manshuriensis*".

Литература

1. Куренцова Г.Э. Реликтовые растения Приморья. – Л.: Наука, 1968. – 72 с.
2. Воробьев Д.П. Дикорастущие деревья и кустарники Дальнего Востока. – Л.: Наука, 1968. – 275 с.
3. Нестерова С.В. Кирказон маньчжурский // Красная книга Приморского края. Растения. – Владивосток: АВК "Апельсин", 2008. – С. 66–68.
4. Корень О.Г., Наконечная О.В., Журавлев Ю.Н. Генетическая структура природных популяций редкого реликтового вида *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae) в нарушенных и ненарушенных местобитаниях // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 6. – С. 773–780.
5. Красная книга РСФСР. Растения. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 590 с.
6. Репродуктивная биология *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae) в условиях интродукции / О.В. Наконечная, О.Г. Корень, С.В. Нестерова [и др.] // Раст. ресурсы. – 2005. – Т. 41. – Вып. 3. – С. 14–25.
7. Строение гинецея и андроеца *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae) / О.В. Наконечная, Т.Ю. Горпенченко, О.Г. Корень [и др.] // Раст. ресурсы. – 2006. – Вып. 3. – С. 37–41.
8. Особенности опыления кирказона маньчжурского / О.В. Наконечная, О.Г. Корень, С.В. Нестерова [и др.] // Изв. РАН. Сер. биол. – 2008. – № 5. – С. 535–542.
9. Наконечная О.В., Корень О.Г., Журавлев Ю.Н. Аллозимная изменчивость реликтового растения *Aristolochia manshuriensis* Kom. (Aristolochiaceae) // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 2. – С. 217–226.
10. Работнов Т.А. Методы семенного размножения травянистых растений в сообществах // Полевая геоботаника. – М.; Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1960. – Т. 2. – С. 20–40.

11. Ценопопуляции растений (основные понятия и структура). – М.: Наука, 1976. – 217 с.
12. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М.: Наука, 1991. – 271 с.
13. Miller M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
14. Pleasant J.M., Wendel J.F. Genetic diversity in a clonal narrow endemic, *Erythronium propullans*, and its widespread progenitor, *Erythronium albidum* // Am. J. Bot. – 1989. – Vol. 76. – № 8. – P. 1136–1151.
15. Ellstrand N.C., Roose M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species // Am. J. Bot. – 1987. – Vol. 74. – № 1. – P. 123–131.
16. Политов Д.В., Белоконов М.М., Белоконов Ю.С. Динамика аллозимной гетерозиготности в дальневосточных популяциях кедрового стланика *Pinus pumila* (Pall.) Regel: сравнение зародышей и материнских растений // Генетика. – 2006. – Т. 42. – № 10. – С. 1348–1358.
17. Наконечная О.В. Биология размножения и генетическая изменчивость кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) в Приморском крае: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2007. – 22 с.



УДК 574.34:579.64

Л.С. Турранен, Е.В. Бородина

ИЗМЕНЕНИЯ В МИКРОБИОТЕ ПИТАТЕЛЬНОГО РАСТВОРА С ЖИДКИМИ ВЫДЕЛЕНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ*

В статье рассматриваются изменения в микробиоте питательного раствора с жидкими выделениями человека, используемого для выращивания растений. Особенно тесные связи обнаружены между продолжительностью поступления жидких нативных выделений человека и бактериями группы кишечных палочек, денитрификаторами, аммонификаторами и уробактериями.

Ключевые слова: замкнутая экосистема, группы микроорганизмов, раствор, жидкие выделения, коэффициент корреляции.

L.S. Tirranen, E.V. Borodina

CHANGES IN THE NUTRIENT SOLUTION MICROBIOTA WITH HUMAN LIQUID WASTE, USED TO GROW THE PLANTS

Changes in the nutrient solution microbiota with human liquid waste used to grow the plants are considered in the article. Especially close connections are discovered between duration of human liquid native waste supply and collibacillus group bacteria, denitrifying agents, ammonifiers and ural bacteria.

Key words: closed ecosystem, microorganism groups, solution, liquid waste, correlation coefficient.

Введение. Нормальная жизнедеятельность человека в замкнутых экологических системах (ЗЭС), для целей жизнеобеспечения которого они и создаются, зависит от бесперебойного функционирования как всей системы в целом, так и составляющих ее звеньев [1]. Поэтому необходима своевременная информация о состоянии каждого звена с целью управления им. Микроорганизмы являются не только постоянным компонентом любого биоценоза, но и индикатором его состояния [1, 2].

Известно, что на микрофлору звена высших растений влияет как сам фитоценоз, так и другие звенья системы [2,3]. Кроме того, ранее проведенные исследования выявили влияние специфических условий ЗЭС на микрофлору исследованных объектов звена высших растений [3,4,5]. В опубликованных нами статьях не было данных о микрофлоре исследуемого объекта при введении мочи в питательный раствор, используемый для выращивания растений в экспериментах с ЗЭС и без замыкания.

Для увеличения замыкания системы жизнеобеспечения по массообмену введена подача жидких выделений человека в питательный раствор. Наиболее известный путь утилизации жидких выделений человека в замкнутой экосистеме – добавление нативной мочи в питательный раствор, используемый для выращивания высших растений. Включение жидких выделений человека в питательный раствор предполагает пря-

* Работа выполнена в Институте биофизики СО РАН.