

### РЕЛИКТОВЫЕ ПОПУЛЯЦИИ *OPLOPANAX ELATUS*: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ\*

Методом аллозимного анализа исследована генетическая и генотипическая изменчивость в двух природных популяциях редкого реликтового вида клонообразующего растения заманихи высокой *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai (Araliaceae).

Исследованием установлено, что показатели генетической изменчивости в среднем ( $P_{95} = 34,6\%$ ,  $A = 1,58$ ,  $H_o = 0,171$ ,  $H_e = 0,155$ ) выше, чем известные для редких видов. Уровень и характер распределения генетического разнообразия *O. elatus* отражают взаимодействие нескольких процессов, однако ключевым является вклад системы размножения вида.

**Ключевые слова:** заманиха высокая, аллозимы, генетическая изменчивость, генотипическая изменчивость.

A.B. Kholina, O.V. Nakonechnaya, O.G. Koren

### OPLOPANAX ELATUS RELICT POPULATIONS: GENETIC AND GENOTYPIC VARIATION

Genetic and genotypic variation of two natural populations of rare relic species of the clone generative plant of devil's-club *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai (Araliaceae) is researched by means of the allozyme analysis method. It is determined by the research that the genetic variation indices in average ( $P_{95} = 34.6\%$ ,  $A = 1.58$ ,  $H_o = 0.171$ ,  $H_e = 0.155$ ) are higher than known for the rare plants. Level and character of genetic diversity distribution of *O. elatus* reflect the interaction of some processes, but the key factor is the species reproduction system contribution.

**Key words:** devil's-club, allozymes, genetic variation, genotypic variation.

**Введение.** Редкий вид заманиха высокая *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai (Araliaceae), занесенный в Красную книгу РСФСР (1988) [1] и Красную книгу Приморского края (2008) [2], является реликтом третичной флоры [3, 4]. Это своеобразный по внешнему виду листопадный кустарник с почти неветвящимся шиповатым стволиком до 1 м высоты и скученными на верхушке красивыми крупными (до 50 см в диаметре) листьями. *O. elatus* относится к небольшому, имеющему дизъюнктивное распространение, роду *Oplopanax*, в состав которого входят еще два вида: *O. japonicus* Nakai, встречающийся только в Японии (о-ва Хоккайдо, Хонсю и Сикоку), и *O. horridus* (Sm.) Miq., распространенный на северо-западе Северной Америки (Тихоокеанское побережье США и Канады) [4]. В России вид встречается только на юге Приморья, представлен несколькими изолированными популяциями, приуроченными к главным вершинам Сихотэ-Алиня, а за ее пределами произрастает на севере Корейского полуострова [4]. Биологически активные вещества *O. elatus* по действию подобны препаратам женьшеня, различные части растений заманихи широко используются в медицине Японии, Кореи и Китая, настой корней разрешен для медицинского применения в России [4–6]. При этом промышленное разведение заманихи с целью получения лекарственного сырья не освоено. Основной угрозой существованию вида является разрушение мест обитания из-за хозяйственной деятельности и ежегодных лесных пожаров, а также неконтролируемый сбор растений. Вид остро нуждается в охране и восстановлении природных популяций как перспективный источник лекарственных средств. Необходимо изучение генетического разнообразия *O. elatus* для сохранения, восстановления и рационального использования генетических ресурсов вида.

**Цель настоящей работы** исследование генетической структуры двух природных популяций *O. elatus* с использованием в качестве маркеров полиморфных ферментных систем.

\* Работа поддержана грантом РФФИ, проект 11-04-98515-р\_восток\_а "Молекулярно-генетическое исследование дальневосточных видов семейства Araliaceae для разработки стратегий их сохранения".

**Материалы и методы исследования.** *O. elatus* – корневищный многолетник, размножается главным образом вегетативно, в клонах насчитывается до 20 и более побегов, которые могут долгое время сохранять связь с материнским растением [3]. Продолжительность жизни одного побега до 40 лет. Семенное размножение неэффективно, семян на отдельных растениях завязывается довольно много, но большинство из них плохо выполнены [4]. Семена прорастают на второй год, при этом подавляющая часть проростков погибает. Общая продолжительность жизни отдельной особи от прорастания семени до отмирания всех частей клона достигает 300 лет [4]. Для анализа были собраны листья растений, находящихся на расстоянии не менее 10 м. Материал для исследований собирали на горах Литовка (29 растений) и Лазовская (15 растений) (Приморский край). Электрофоретический анализ был проведен по 8 ферментным системам, предположительно кодируемым 13 локусами. Экстракцию, электрофорез и гистохимическое окрашивание изоферментов проводили, как описано ранее [7, 8]. Исследованные ферментные системы представлены в таблице 1. Аллели обозначали в соответствии с электрофоретической подвижностью по отношению к наиболее распространенному варианту, подвижность которого принимается за 1,00. Показатели полиморфности (P), среднего числа аллелей на locus (A), средней наблюдаемой ( $H_o$ ) и ожидаемой ( $H_e$ ) гетерозиготности рассчитывали общепринятыми методами [9, 10]. Статистическую обработку проводили с использованием программы TFPGA [11]. Для анализа популяционно-генетической структуры использовали F-статистики Райта [12]. Генотипическое разнообразие оценивали как соотношение G/N, где G – количество различных генотипов и N – размер выборки [13], а также с помощью модифицированного индекса разнообразия Симпсона (D), используемого для клональных растений [13, 14]:  $D = 1 - [\sum n_i(n_i - 1)]/[N(N - 1)]$ , где  $n_i$  – число растений с анализируемым фенотипом  $i$  и N – общее число проанализированных растений.

**Результаты исследования и обсуждение.** В ходе исследования изучено 10 ферментных систем, 8 из которых стабильно выявлялись. Было идентифицировано 22 аллельных варианта, предположительно кодируемых 13 локусами (табл. 1), из них 7 генов являются мономорфными и 6 – полиморфными. Три полиморфных локуса оказались высоко изменчивыми (наблюдаемая гетерозиготность – не ниже 35%): *Fe-1* – 0,479, *Gpi-3* – 0,979, *Pgm-2* – 0,496.

Таблица 1

**Исследованные ферментные системы и количество полиморфных локусов и аллелей, выявленных в листьях *Oplopanax elatus***

Фермент	Сокращение	Номер по К.Ф.	Интерпретируемые локусы	Полиморфные локусы	Аллель
Алкогольдегидрогеназа	ADH	1.1.1.1	1	0	1
Альдолаза	ALD	4.1.2.13	1	1	2
Аспаратаминотрансфераза	AAT	2.6.1.1	2	1	4
Глюкозофосфатизомераза	GPI	5.3.1.9	1	1	3
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1	1	1	3
Флюоресцентная эстераза	FE	3.1.1.2	4	1	5
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1	2	1	3
6-фосфоглюконат дегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44	1	0	1
Всего			13	6	22

По каждому полиморфному локусу обнаружено от 2 до 4 аллелей, тест на гетерогенность показал значимые различия по частотам аллелей между популяциями (табл. 2). Локусы *Ald* и *Aat-1* были полиморфными только в популяции горы Лазовская; аллели *Ald*<sup>0.85</sup>, *Aat-1*<sup>0.85</sup>, *Aat-1*<sup>1.10</sup>, *Aat-1*<sup>1.20</sup> были обнаружены только в этой популяции, *Lap-1*<sup>1.05</sup> – только в популяции горы Литовка.

Таблица 2

**Частоты аллелей 6 полиморфных локусов в популяциях  
*Oriopanax elatus* и тест на гетерогенность**

Локус	Аллель	Популяция	
		Литовка (N = 29)	Лазовская (N = 15)
Pgm-2	0,85	0,414	0,400
	1,00	0,586	0,600
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 0,0156$ ; df = 1; p > 0,01			
Ald	0,85	0,0000	0,0667
	1,00	1,0000	0,9333
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 3,4188$ ; df = 1 p > 0,01			
Fe-1	1,00	0,569	0,667
	1,10	0,431	0,333
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 0,7879$ ; df = 1; p > 0,01			
Локус	Аллели	Популяция	
		Литовка (N = 29)	Лазовская (N = 15)
Gpi-3	0,55	0,086	0,067
	0,75	0,121	0,467
	1,00	0,793	0,467
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 9,7123$ ; df = 1; p < 0,01			
Lap-1	0,95	0,069	0,033
	1,00	0,862	0,967
	1,05	0,069	0,000
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 2,1675$ ; df = 1; p > 0,01			
Aat-1	0,85	0,0000	0,033
	1,00	1,0000	0,367
	1,10	0,0000	0,367
	1,20	0,0000	0,233
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 24,3048$ ; df = 1; p < 0,01			
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 40,468$ ; df = 6; p < 0,01			

Примечание: N – число исследованных растений.

На основе аллельных частот 13 локусов были рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма, отражающие уровень изменчивости *O. elatus* (табл. 3). Обнаружено, что в среднем в изученных популяциях около 30% генов находится в полиморфном состоянии и каждое растение гетерозиготно по 17,1% своих локусов. Более высокими показателями полиморфизма характеризуется популяция горы Лазовской.

Таблица 3

**Основные показатели генетической и генотипической изменчивости  
в популяциях *Oriopanax elatus***

Популяция	N	P <sub>95</sub> , %	P <sub>99</sub> , %	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	A	n <sub>e</sub>	G	G/N	D
Литовка	29	30.8	30.8	0.151	0.123	1.46	1.14	22	0.76	0.97
Лазовская	15	38.5	46.2	0.190	0.187	1.69	1.23	14	0.93	0.99
Среднее по популяциям	22	34.6	38.46	0.171	0.155	1.58	1.18	18	0.85	0.98

Примечание: N – количество исследованных растений; P<sub>95</sub>, P<sub>99</sub>, % – полиморфность с учетом 95 и 99% критерия; H<sub>o</sub> – наблюдаемая гетерозиготность; H<sub>e</sub> – ожидаемая гетерозиготность; A – количество аллелей на локус; n<sub>e</sub> – эффективное число аллелей; G – число различных генотипов; G/N – генотипическое разнообразие; D – индекс разнообразия Симпсона для клональных растений.

Средние показатели по популяциям (P<sub>95</sub> = 34,6%; A = 1,58; H<sub>o</sub> = 0,171; H<sub>e</sub> = 0,155) оказались выше средних значений, установленных в популяциях редких видов (P = 29,9%, A = 1,53, H<sub>e</sub> = 0,095) [15]. Среднее значение показателя клонального разнообразия в популяциях (G/N = 0,85) было значительно выше, значения, определенного для 45 видов клонообразующих растений (G/N = 0,27 [16]). Ситуация является не совсем

обычной для редкого реликтового растения с фрагментированным ареалом; при этом весьма вероятно, что вид перенес в историческом прошлом резкое сокращение численности (“бутылочное горлышко”), когда во время оледенений происходило значительное сокращение ареала листопадных тургайских лесов, оттесненных к югу.

За счет чего мог сохраниться и поддерживаться определенный уровень полиморфизма в популяциях *O. elatus*? Это может быть обусловлено действием комплекса факторов. В обеих локальностях величина наблюдаемой гетерозиготности выше по сравнению с теоретически рассчитанной из соотношения Харди-Вайнберга, что позволяет предположить направленное действие отбора на северной границе ареала в пользу гетерозиготных генотипов. Кроме того, вероятно, исходным материалом при возникновении изученных популяций *O. elatus* послужили гетерозиготные растения, особенно если они обладали повышенной жизнеспособностью. Однако мы полагаем, что ключевым фактором является репродуктивная биология вида. Известно, что система размножения – одна из наиболее важных биологических особенностей, ответственных за уровень полиморфизма и характер его распределения между популяциями [17]. Для многих видов с преимущественно вегетативным способом размножения установлены высокие показатели генетической изменчивости, что свидетельствует о наличии семенной репродукции, при этом слабое семенное возобновление компенсируется долговечностью генет [18]. Высокий уровень клонального разнообразия у таких видов также объясняется наличием спорадического семенного воспроизводства; известно, что для его поддержания достаточно даже небольшого числа особей, появившихся в результате полового размножения [19, 20]. В изученных популяциях *O. elatus* при вегетативном размножении возобновляется определенное количество наиболее приспособленных, вероятнее всего, гетерозиготных растений. С учетом того, что продолжительность жизни клонов достигает 300 лет [4], отчасти за счет этого поддерживается уровень гетерозиготности. Полученные нами данные (наличие большого числа разнообразных генотипов) свидетельствуют о происходящей в популяциях заманихи периодической половой репродукции, что вносит свой вклад в поддержание генетического полиморфизма. Кроме того, как установлено для ряда клонообразующих видов [18], долговечность клонов допускает возможность накопления соматических мутаций и сохранение возникающих изменений путем вегетативного размножения. В случае с *O. elatus*, это также может способствовать формированию обнаруженного уровня генетического разнообразия.

Географическая изолированность двух изученных местообитаний заманихи отразилась на степени их подразделенности (табл. 4). Отрицательное значение  $F_{IS}$  (-0,140) свидетельствует о полном отсутствии инбридинга и избытке гетерозигот, маловероятном в случае свободного скрещивания. Значение  $F_{ST}$  указывает, что на межпопуляционную составляющую изменчивости приходится 17,3%. Обнаруженный уровень межпопуляционной дифференциации связан как с современной фрагментацией ареала, так и с особенностями размножения вида. Недостаточное количество опылителей, плохая выполненность семян, слабая выживаемость проростков – все это ограничивает обмен генами и приводит к генетической дивергенции популяций.

Таблица 4

Показатели F-статистик Райта для популяций *Orlopanax elatus*

Локус	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
<i>Aat-1</i>	0,524	0,784	0,546
<i>Aat-2</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Ald</i>	-0,048	0,028	0,073
<i>Adh</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Fe-2</i>	-0,368	-0,363	0,004
<i>Fe-2</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Fe-3</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Fe-4</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Gpi</i>	0,212	0,360	0,188
<i>Lap</i>	0,163	0,175	0,015
<i>Pgm-1</i>	0,000	0,000	0,000
<i>Pgm-2</i>	-0,680	-0,693	-0,008
<i>6-pgd</i>	0,000	0,000	0,000
По всем	-0,140	0,057	0,173

Примечание:  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга особи относительно популяции;  $F_{IT}$  – коэффициент инбридинга особи относительно всего вида;  $F_{ST}$  – показатель подразделенности популяций.

**Заключение.** Уровень и характер распределения генетического разнообразия *O. elatus* отражают взаимодействие нескольких процессов, таких как фрагментация ареала, изоляция популяций, влияние отбора на северной границе ареала. Однако ключевым, по нашему мнению, является вклад системы размножения вида. Наличие гибкой репродуктивной системы, сочетающей различные способы размножения, позволяет с помощью клонального роста возобновлять гетерозиготные генотипы, с одной стороны, с другой – при спорадическом семенном воспроизводстве вносить дополнительные ресурсы изменчивости. В то же время особенности биологии вида – значительная продолжительность жизни отдельного клона, наличие перекрывающихся поколений, способность к перекрестному опылению – также способствуют поддержанию определенного уровня полиморфизма.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднику лаборатории биотехнологии БПИ ДВО РАН Ирине Леонидовне Кац за сбор материала.

### Литература

1. Красная книга РСФСР. Растения. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 590 с.
2. Красная книга Приморского края. Растения. – Владивосток: АВК “Апельсин”, 2008. – 688 с.
3. Куренцова Г.Э. Реликтовые растения Приморья. – Л.: Наука, 1968. – 72 с.
4. Журавлев Ю.Н., Коляда А.С. Agaliaceae: женьшень и другие. – Владивосток: Дальнаука, 1996. – 280 с.
5. Шретер А.И. Лекарственная флора советского Дальнего Востока. – М.: Медицина, 1975. – 328 с.
6. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия). – М.: Металлургия, 1989. – 428 с.
7. 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. – № 4. – С. 497–505.
8. Генетическая изменчивость заманихи высокой *Oplorhiza elatus* (Nakai) Nakai (Agaliaceae) / А.Б. Холина [и др.] // Генетика. – 2010. – № 5. – С. 631–639.
9. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель: Полеспечать, 1989. – 164 с.
10. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М.: Наука, – 1991. – 271 с.
11. 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.
12. Wright S. The genetical structure of population // Ann. Eugen. – 1951. – Vol. 15. – P. 323–354.
13. 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.
14. Ellstrand N.C., Roose M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species // Am. J. Bot. – 1987. – Vol. 74. – № 1. – P. 123–131.
15. Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners // Am. J. Bot. – 2000. – Vol. 87. – № 6. – P. 783–792.
16. Widen B., Cronberg N., Widen M. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey // Folia Geobot. Phytotax. – Praha, 1994. – Vol. 29. – P. 245–263.
17. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species // Phil. Trans. R. Soc. – Lond., 1996. – Vol. 351. – P. 1291–1298.
18. de Witte L.C., Stöcklin J. Longevity of clonal plants: why it matters and how to measure it // Ann. Bot. – 2010. – Vol. 106. – P. 859–870.
19. Watkinson A.R., Powell J.C. Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant population – a computer simulation of *Ranunculus repens* // Journal of Ecology. – 1993. – Vol. 81. – № 4. – P. 707–717.
20. Stehlik I., Holderegger R. Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemrosa* in late successional deciduous woodlands of Central Europe // Journal of Ecology. – 2002. – Vol. 88. – № 3. – P. 424–435.