

А.Н. Кравченко, А.Я. Ларионова, Д.В. Политов, М.М. Белоконь, Ю.С. Белоконь

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЕЛИ СИБИРСКОЙ В ЗАПАДНОМ САЯНЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 03-04-49719), СО РАН (проект № 145) и ОБН РАН (госконтракт по теме «Биоресурсы» программа «Динамика генофондов...»).

На основании анализа 24 генов, кодирующих аллозимное разнообразие 13 ферментов: GOT, NDH, FDH, GDH, IDH, LAP, MDH, 6-PGD, PGI, PGM, PEPC, SOD, SKDH установлены основные показатели генетического разнообразия и дифференциации ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в Западном Саяне.

Введение

В настоящее время во многих странах мира развернуты широкомасштабные исследования генетического разнообразия лесобразующих видов хвойных методом электрофоретического анализа изоферментов. Использование этого метода дает возможность определить состояние генетических ресурсов основных компонентов лесных экосистем, включая точную оценку запаса генетической изменчивости, характера ее распределения в пределах ареалов видов, степени внутривидовой дифференциации популяций. В задачи данной работы входило изучение внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в Западном Саяне.

Материал и методы исследований

Материалом для исследования послужили вегетативные почки, собранные с 80 деревьев в трех природных популяциях ели сибирской. Одна из популяций расположена в Туранском районе Тувы, две другие - в Ермаковском районе Красноярского края: в окрестностях поселка Арадан и вблизи ручья Билелик. Пятьдесят почек с каждого дерева растирали в 50 мкл экстрагирующего буфера: 0,05М трис-НСl pH 8,0, в который были добавлены дитиотрейтол до концентрации $3,63 \cdot 10^3$ М и трилон Б до концентрации $4,56 \cdot 10^4$ М. Электрофоретическое разделение ферментов осуществляли методом горизонтального электрофореза в 13%-м крахмальном геле в трех буферных системах: I - морфолин-цитратной pH 7.0 [1], II - трис-ЭДТА-боратной pH 8.6 [2]; III - трис-цитратной pH 8.5 / гидроокись лития-боратной pH 8.1 [3]. Гистохимическое выявление ферментов проводили по стандартным прописям [1, 2, 4, 5] с некоторыми модификациями. В табл. 1 представлены ферменты и использованные для их разделения буферные системы.

Для оценки уровня генетического разнообразия рассчитывали следующие показатели: процент полиморфных локусов при 99%-м критерии полиморфности (P_{99}), среднее число аллелей на локус (A), средняя

Таблица 1

Ферменты и буферные системы, используемые в работе

Фермент	Аббревиатура	Кодовый номер	Буферная Система
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37	I
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42	I
Шикиматдегидрогеназа	SKDH	1.1.1.25	I
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44	I
Фосфоенолпируваткарбоксилаза	PEPC	4.1.1.31	I
NADH-дегидрогеназа	NDH	1.6.99.3	I
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза	GOT	2.6.1.1	II
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1	II
Фосфоглюкоизомераза	PGI	5.3.1.9.	II
Формиатдегидрогеназа	FDH	1.2.1.2	II
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1	II
Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.1.3	III
Супероксиддисмутаза	SOD	1.15.1.1	III

наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготности, эффективное число аллелей (n_e). Популяционную структуру и степень генетической подразделенности популяций определяли с помощью показателей F-статистики Райта [6] и генетической дистанции М. Неи [7]. Для вычисления показателей использовали пакет компьютерных программ POPGEN 1.32 [8] и BIOSYS 1 [9].

Результаты

В ходе электрофоретических исследований выявлено 49 аллозимных вариантов, кодируемых аллелями 24 локусов. Семь локусов (Got-1, Got-2, Mdh-2, Peps, 6-Pgd-3, Pgm-1, Sod-1) оказались мономорфными, остальные локусы (Fdh, Gdh, Got-3, Idh-1, Idh-2, Lap-1, Lap-2, Ndh-2, Mdh-1, Mdh-3, 6-Pgd-2, Pgi-1, Pgi-2, Pgm-2, Skdh-1, Skdh-2, Sod-2) полиморфны. Параметры генетической изменчивости, включенные в анализ популяций ели сибирской, рассчитанные по частотам аллелей 24 локусов, представлены в табл. 2. Наиболее высокий уровень генетической изменчивости обнаруживает популяция из Тувы. Значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в этой популяции составляют соответственно 0,171 и 0,176, эффективное число аллелей 1,28. В целом в популяциях ели сибирской из Западного Саяна в полиморфном состоянии находится около 71% структурных генов, а каждое дерево гетерозиготно в среднем по 16-17% генов. Полученные значения указывают на достаточно высокий уровень генетического разнообразия ели сибирской в исследуемом регионе.

Таблица 2

Параметры генетической изменчивости ели сибирской в Западном Саяне

Популяции	N*	P ₉₉ , %	A	H _o	H _e **	N _e
Тува	27	62.5	1.79 (0.721)***	0.171 (0.194)	0.176 (0.189)	1.28 (0.341)
Билелик	25	62.5	1.83 (0.761)	0.159 (0.167)	0.173 (0.169)	1.26 (0.272)
Арадан	28	58.3	1.79 (0.779)	0.156 (0.173)	0.164 (0.179)	1.26 (0.323)
В целом	80	70.8	2.04 (0.859)	0.162 (0.166)	0.173 (0.170)	1.26 (0.291)

Примечание. * число деревьев; ** несмещенная оценка [7]; *** среднее стандартное отклонение.

Расчет коэффициентов инбридинга Райта [6] показал, что исследованные популяции ели сибирской не испытывают значительного дефицита гетерозиготных генотипов ($F_{is} = 0,0341$, $F_{st} = 0,0595$), то есть находятся в состоянии, близком к равновесию Харди-Вайнберга (табл. 3).

Большая часть выявленной у ели сибирской из Западного Саяна генетической изменчивости реализуется внутри популяций, на долю межпопуляционного разнообразия приходится лишь 2,63% ($F_{st}=0,0263$). Генетическое расстояние D [7] между популяциями варьирует от 0,003 до 0,006, составляя в среднем 0,004 (табл. 4). Полученные значения F_{st} и D указывают на слабую дифференциацию популяций ели в Западном Саяне. Наиболее существенные различия по частотам аллелей 24 локусов обнаруживают более удаленные друг от друга популяции из Тувы и Арадана.

Таблица 3

Значения показателей F-статистик Райта

Локус	F _{IS}	F _{ST}	F _{IT}
Fdh	0.1132	0.0518	0.1591
Gdh	0.0745	0.0312	0.1034
Got-3	-0.0502	0.0107	-0.0390
Idh-1	0.3434	0.0117	0.3511
Idh-2	0.1351	0.0501	0.1784
Lap-1	0.1516	0.0100	0.1601
Lap-2	0.1711	0.0735	0.2320
Ndh	0.1314	0.0221	0.1506
Mdh-1	-0.0189	0.0123	-0.0063
Mdh-3	0.0964	0.0556	0.1467
Pgd-2	-0.0463	0.0122	-0.0335
Pgi-1	-0.0204	0.0138	-0.0063
Pgi-2	-0.0982	0.0421	-0.0520
Pgm-2	0.1545	0.0144	0.1667
Skdh-1	-0.1137	0.0138	-0.0984
Skdh-2	-0.1011	0.0115	-0.0884
Sod-2	-0.1181	0.0007	-0.1174
Среднее	0.0341	0.0263	0.0595

Значения коэффициентов генетической дистанции D

Популяции	Билелик	Арадан
Тува	0,004	0,006
Билелик	-	0,003

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что произрастающая в Западном Саяне ель сибирская характеризуется достаточно высоким уровнем внутривидового и низким уровнем межвидового разнообразия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Manchenko G.P.* Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. - CRC Press, Ins., 1994. - 574 p.
2. *Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др.* Генетика изоферментов. - М.: Наука, 1977. - 278 с.
3. *Ridgway G.J., Sherburne S.W., Lewis R.D.* Polymorphisms in the esterases of Atlantic herring // *Trans. Amer. Fish. Soc.* - 1970. - V. 99. - P. 147-151.
4. *Brewer G.J.* Introduction to isozyme techniques. - N.Y.-L.: Academ. press, 1970. - 186 p.
5. *Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е.* Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. - Гомель: БелНИИЛХ, 1988. - 68 с.
6. *Guries R.P., Ledig F.T.* Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // *Evolution.* - 1982. - V. 36. - P. 387-402.
7. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics.* - 1978. - V. 89. - P. 583-590.
8. *Yeh F.C.H., Yang R., Boyle T.* POPGENE Version 1.32: Microsoft Windows - based Freeware for population genetic analysis, 1999.
9. *Swofford D.L., Selander R.B.* BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // *Heredity.* - 1981. - V. 72. - P. 281-283.