

А.К. Экарт, А.Я. Ларионова, М.М. Белоконов, Ю.С. Белоконов, Д.В. Политов

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ РАЗНОВЫСОТНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПИХТЫ 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 19 генов, кодирующих аллозимное разнообразие 11 ферментов: IDH, NDH, MDH, SKDH, FE, GDH, PGM, SOD, GOT, LAP, PGI определены основные параметры генетической изменчивости и дифференциации популяций пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.), произрастающей в разных высотных поясах Западного Саяна. Установлено, что включенные в исследование горные популяции пихты (400 м, 1000 м и 1500 м над ур. моря) характеризуются невысоким уровнем генетической изменчивости. В целом в изученных популяциях пихты в полиморфном состоянии находится 47,37% структурных генов, а каждое дерево обнаруживает изменчивость по 8,7% генов. Около 96% выявленной изменчивости реализуется внутри популяций, остальная распределяется между популяциями. Количественная оценка степени генетических различий между популяциями показала, что наиболее дифференцированы друг от друга удаленные по градиенту высоты низкогорная и высокогорная популяции.

Пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb) - один из наиболее распространенных видов рода *Abies* в России. Ее ареал охватывает громадную территорию, включающую северо-восток европейской части России, Урал, большую часть лесной зоны Сибири. Западная граница ареала пихты сибирской приурочена к верховьям реки Ваги в районе г. Вологды. На севере в низовьях Енисея пихта заходит за Полярный круг. На востоке она достигает верховьев реки Алдана, на юге растет в горных районах Алтая, в Джунгарском Алатау (Казахстан), в республике Тыва [1]. Генетическое разнообразие и внутривидовая дифференциация пихты сибирской изучены слабо. К настоящему времени получены данные о генетической изменчивости лишь небольшого числа популяций этого вида [2, 3]. В задачи данной работы входило изучение уровня генетического разнообразия и степени дифференциации разновысотных популяций пихты сибирской в Западном Саяне.

Объекты, материалы и методы исследований

В анализ включены три ценопопуляции пихты сибирской, произрастающей в горах Западного Саяна на различных высотах над уровнем моря. Первая популяция (П-1500) расположена на высоте 1500 м над уровнем моря. Тип леса: крупнотравный субальпийский. Средний возраст деревьев 130 лет. Согласно классификации В.Ф. Лебкова [4], разработанной для гор Южной Сибири, в которой учтены не только абсолютные высоты, но и крутизна склонов, положение территории относительно верхнего предела лесной растительности, популяцию П-1500 можно отнести к высокогорным. Вторая популяция (П-1000), расположенная в среднегорье на высоте 1000 м над уровнем моря, представлена крупнотравным пихтарником. Средний возраст деревьев 130 лет. Третья популяция (П-400) локализована на высоте 400 м над уровнем моря. В этой популяции пихта сибирская произрастает совместно с осинкой (*Populus tremula* L.) и березой (*Betula pendula* Both). Состав древостоя: 5ПЗ02Б, тип леса: крупнотравный низкогорный. Средний возраст деревьев 100 лет.

В качестве материала для исследования использовали вегетативные почки, собранные отдельно с каждого из 84 деревьев, отобранных в 3-х ценопопуляциях. Пять-десять почек растирали в 50 мкл экстрагирующего буфера: 0,05М трис-НСl pH 8,0, в который были добавлены β -меркаптоэтанол до концентрации 0,05% и поливинилпирролидон до 3%-й концентрации.

Фракционирование ферментов проводили методом горизонтального электрофореза в 13%-м крахмальном геле в трех буферных системах: А - морфолин-цитратной pH 7,0 [5], Б - трис-ЭДТА-боратной pH 8,6 [6], В - трис-цитратной pH 8,5 / гидроокись лития-боратной pH 8,1 [7]. Гистохимическое выявление ферментов осуществляли по стандартным прописям [5, 6, 8, 9] с некоторыми модификациями. Обозначение ферментов, локусов и аллелей производили по С. Пракашу с соавторами [10]. Нуль-аллели обозначали буквой и. В табл. 1 представлены включенные в анализ ферменты и использованные для их электрофоретического разделения буферные системы.

Для оценки уровня генетического разнообразия рассчитывали следующие общепринятые в генетико-популяционных исследованиях показатели: процент полиморфных локусов при 95%-м (P_{95}) и 99%-м (P_{99}) критериях полиморфности (частота наиболее распространенного аллеля не превышает соответственно 95 и 99%), среднее число аллелей на локус (A), среднюю наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности, эффективное число аллелей (n_e). Популяционную структуру и степень генетической подразделенности популяций определяли с помощью показателей F-статистики Райта [11] и генетической дистанции М. Неи [12].

Для вычисления показателей использовали пакет компьютерных программ POPGEN 1,32 [13] и BIOSYS 1 [14].

Таблица 1

Ферменты, их аббревиатура, классификационный номер и буферные системы, используемые в работе

Фермент	Аббревиатура	КФ	Буферная система
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42	А
NADH-дегидрогеназа	NDH	1.6.99.3	А
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37	А
Шикиматдегидрогеназа	SKDH	1.1.1.25	А
Флюоресцентная эстераза	FE	3.1.1.2	Б
Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.2.3	Б
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1	Б
Супероксиддисмутаза	SOD	1.15.1.1	Б
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза	GOT	2.6.1.1	В
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1	В
Фосфоглюкоизомераза	PGI	5.3.1.9	В

Результаты исследования

В ходе электрофоретического анализа 11 ферментов в трех разновысотных популяциях пихты сибирской из Западного Саяна выявлено 34 аллельных варианта, кодируемых 19 локусами. Локусы: Fe-2, Got-1, Idh-2, Lap-1, Ndh, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-4, Pgm-1, Sod-3 оказались мономорфными, остальные локусы (Gdh, Got-2, Lap-2, Mdh-3, Pgi-2, Pgm-2, Skdh-1, Sod-1, Sod-2) полиморфны. Локусы Got-2, Pgi-2, Sod-1, Sod-2 имеют по два аллеля. В четырех локусах: Gdh, Lap-2, Mdh-3, Skdh-1 выявлено по три аллеля. Лocus Pgm-2 представлен в популяциях четырьмя аллелями. Наиболее низкий уровень полиморфизма среди полиморфных локусов обнаруживает locus Sod-2. Один из двух альтернативных аллелей, выявленных в этом локусе, встречается в популяциях с частотой не превышающей 2%. В табл. 2 приведены частоты аллелей всех включенных в исследование ген-ферментных локусов.

На основании аллельных частот в каждой популяции пихты сибирской были определены основные показатели генетической изменчивости. Из представленных в табл. 3 данных видно, что значения этих показателей варьируют в разных популяциях. Так, доля полиморфных локусов при 99%-м критерии полиморфности изменяется от 31,58% до 42,11%, среднее число аллелей на locus от 1,5263 до 1,5789, наблюдаемая гетерозиготность от 0,0846 до 0,0897, ожидаемая гетерозиготность от 0,0796 до 0,1206, эффективное число аллелей от 1,1413 до 1,2225. Обнаружено, что высокогорная популяция пихты (П-1500) при более низком, чем в других популяциях проценте полиморфных локусов и меньшем аллельном разнообразии, имеет самые высокие значения ожидаемой гетерозиготности и эффективного числа аллелей. С уменьшением высоты местоположения популяций значения этих показателей снижаются. Максимальное для изученных популяций пихты сибирской значение наблюдаемой гетерозиготности выявлено в низкогорной популяции (П-400). В целом в изученных популяциях этого вида из Западного Саяна в полиморфном состоянии находится 42,1% проанализированных локусов при 95%-м критерии полиморфности и 47,37% при 99%-м критерии. Среднее число аллелей на locus равно 1,789, эффективное число аллелей - 1,186. Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составляют соответственно 0,0867 и 0,1037.

Расчет индекса фиксации Райта F_{is} (табл. 3), отражающего инбридинг особи относительно популяции, показал, что в низкогорной популяции пихты сибирской наблюдается избыток ($F_{is} = -0,1269$), а в среднегорной и высокогорной популяциях - дефицит гетерозиготных генотипов ($F_{is} = +0,1714$, $F_{is} = +0,2869$ соответственно), вызванный инбридингом. Достоверные отклонения в генотипических пропорциях, связанные с недостатком гетерозиготных генотипов, выявляются при разных уровнях значимости не менее чем у 3-4 локусов в каждой популяции. Чаще всего дефицит гетерозиготности обнаруживают локусы: Lap-2, Gdh, Skdh-1, Got-2.

Наиболее значительный дефицит гетерозигот установлен в высокогорной популяции пихты, в которой наблюдается интенсивное усыхание древостоев. Среднее для изученных популяций значение F_{is} равно +0,1231. Это означает, что инбридинг особи относительно популяции составляет 12,31%. Показатель F_{it} , отражающий инбридинг особи относительно вида в целом, несколько выше - 0,1602 (табл. 4).

Частоты аллелей 19 ген-ферментных локусов в популяциях пихты сибирской из Западного Саяна

Локус	Аллель	Популяции		
		П-1500	П-1000	П-400
Fe-2	1,00	1,000	1,000	1,000
Gdh	1,05	0,103	0,161	-
	1,00	0,776	0,839	1,000
	0,95	0,121	-	-
Got-1	1,00	1,000	1,000	1,000
Got-2	1,00	0,879	0,982	0,963
	N	0,121	0,018	0,037
Idh-2	1,00	1,000	1,000	1,000
Lap-1	1,00	1,000	1,000	1,000
Lap-2	1,02	-	0,054	-
	1,00	0,638	0,821	0,907
	N	0,362	0,125	0,093
Ndh	1,00	1,000	1,000	1,000
Mdh-1	1,00	1,000	1,000	1,000
Mdh-2	1,00	1,000	1,000	1,000
Mdh-3	1,31	-	0,036	0,019
	1,00	0,914	0,875	0,944
	0,78	0,086	0,089	0,037
Mdh-4	1,00	1,000	1,000	1,000
Pgi-2	1,03	-	0,054	0,167
	1,00	1,000	0,946	0,833
Pgm-1	1,00	1,000	1,000	1,000
Pgm-2	1,14	0,239	0,286	0,185
	1,00	0,543	0,375	0,519
	0,95	0,196	0,339	0,278
	0,84	0,022	-	0,019
Skdh-1	1,02	0,114	-	-
	1,00	0,727	0,839	0,926
	0,94	0,159	0,161	0,074
Sod-1	1,33	-	-	0,056
	1,00	1,000	1,000	0,944
Sod-2	1,00	1,000	0,982	1,000
	0,82	-	0,018	-
Sod-3	1,00	1,000	1,000	1,000

Около 96% генетической изменчивости, выявленной у пихты сибирской из Западного Саяна, реализуется внутри популяций. На долю межпопуляционной составляющей приходится всего 4,23% ($F_{st} = 0,0423$). Генетическое расстояние D [12] между популяциями, рассчитанное по частотам аллелей 19 ген-

Таблица 3

Параметры генетической изменчивости пихты сибирской в Западном Саяне

Популяции	Число деревьев	$P_{95}, \%$	$P_{99}, \%$	A	H_o	H_e^*	n_e	F_{is}
П-1500	29	31,58	31,58	1,5263 (0,9048)**	0,0860 (0,1797)	0,1206 (0,2033)	1,2225 (0,4255)	0,2869
П-1000	28	31,58	42,11	1,5789 (0,7685)	0,0846 (0,1589)	0,1021 (0,1781)	1,1906 (0,4556)	0,1714
П-400	27	31,58	36,84	1,5563 (0,8412)	0,0897 (0,1816)	0,0796 (0,1555)	1,1413 (0,3738)	-0,1269
В целом	84	42,10	47,37	1,7895 (0,9763)	0,0867 (0,1657)	0,1037 (0,1714)	1,1865 (0,4198)	0,1231

* - несмещенная оценка [12]; ** - среднее стандартное отклонение.

ферментных локусов, варьирует от 0,003 до 0,008 (табл. 5), составляя в среднем 0,005. Полученные значения F_{st} и D указывают на слабую подразделенность изученных популяций пихты. Наиболее существенные различия в генетической структуре обнаруживают низкогорная и высокогорная популяции. Уровень генетиче-

ских различий между этими популяциями в 2 раза выше, чем между другими сравниваемыми парами популяций: высокогорной и среднегорной, низкогорной и среднегорной.

Таблица 4

Значения показателей F-статистики Райта: F_{is} , F_{it} , F_{st}

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
Gdh	0,5688	0,5997	0,0718
Got-2	0,3308	0,3550	0,0362
Lap-2	0,2396	0,3016	0,0815
Mdh-3	-0,0911	-0,0805	0,0097
Pgi-2	-0,1617	-0,0792	0,0710
Pgm-2	-0,1039	-0,0853	0,0168
Skdh-1	0,3635	0,3878	0,0382
Sod-1	-0,0588	-0,0189	0,0377
Sod-2	-0,0182	-0,0060	0,0120
Среднее	0,1231	0,1602	0,0423

Таблица 5

Генетическое расстояние D [12] между разновысотными популяциями пихты сибирской

Популяции	П-1000	П-400
П-1500	0,004	0,008
П-1000		0,003

Таким образом, в результате проведенных исследований получены данные, свидетельствующие о том, что произрастающая в горах Западного Саяна пихта сибирская характеризуется сравнительно невысоким в среднем уровнем генетического разнообразия и слабой подразделенностью популяций. Установлено, что степень генетической дифференциации популяций зависит от разности высот местоположения этих популяций. Наиболее существенные различия в генетической структуре обнаруживают более удаленные друг от друга по градиенту высоты низкогорная и высокогорная популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фалалеев Э.Н. Пихта. Библиотечка // Древесные породы. - М.: Лесная промышленность, 1982. - С. 85.
2. Гончаренко Г.Г., Силин А.Е., Падутов А.Е., Падутов В.Е. Генетические ресурсы сосен, елей и пихт бывшего Советского Союза: анализ состояния генофонда, филогенетических взаимоотношений и организации генома // Программы сохранения и постоянного воспроизводства лесных генетических ресурсов в Новых Независимых Государствах бывшего СССР. Материалы совещания. - Беловежа, Беларусь, 1996. - С. 89-103.
3. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е. Генетическая структура, таксоно-метрические и филогенетические взаимоотношения у пихт СНГ // ДАН. - 1995. - Т. 342. - № 1. - С. 122-126.
4. Лебков В.Ф. Организация хозяйства в горных лесах Южной Сибири. - Красноярск: Кн. изд-во, 1967. - 287 с.
5. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. - CRC Press, Ins., 1994. - 574 p.
6. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. - М.: Наука, 1977. - 278 с.
7. 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.
8. Brewer G.J. Introduction to isozyme techniques. - N.Y.-L.: Academ. press, 1970. - 186 p.
9. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. - Гомель: БелНИИЛХ, 1988. - 68 с.
10. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. IV Patterns of genie variation in central, marginal, and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. - 1969. - V. 61. - P. 841-858.
11. Guries R.P., Ledig F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. - 1982. - V. 36. - P. 387-402.
12. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. - 1978. - V. 89. - P. 583-590.
13. Yeh F.C.H., Yang R., Boyle T. POPGENE Version 1.32: Microsoft Windows - based Freeware for population genetic analysis, 1999.
14. 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.