

Н.В. Орешкова, А.Я. Ларионова

ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ ГМЕЛИНА

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 03-04-49719),
ККФН (грант № 14G165), интеграционного проекта СО РАН № 53,
ОБН РАН (госконтракт по теме «Биоресурсы», программа «Динамика генофондов...»).

Представлены результаты исследования генетического разнообразия, структуры и степени дифференциации популяций лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) в Центральной Эвенкии и Восточном Забайкалье. Показано, что произрастающая в Забайкалье лиственница значительно отличается от лиственницы из Эвенкии. Генетическое расстояние D между популяциями из этих районов, рассчитанное по частотам аллелей 17 ген-ферментных локусов, варьирует от 0,0270 до 0,0343, составляя в среднем 0,03. Полученные данные указывают на генетическую обособленность популяций лиственницы из Эвенкии и Восточного Забайкалья и могут быть обоснованием для выделения их в отдельные внутривидовые таксоны.

Введение

Изучение генетического разнообразия лесообразующих видов хвойных является одной из важных проблем современной биологии. Под воздействием дестабилизирующих природных и антропогенных факторов происходит постепенное истощение генетических ресурсов лесов, снижение их устойчивости и продуктивности. Поэтому необходимы точные сведения о генетической структуре популяций различных видов хвойных, уровнях их внутри- и межпопуляционного разнообразия, степени генетической дифференциации в разных частях ареалов. Целью данной работы являлось изучение генетического разнообразия и степени дифференциации популяций лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) из Центральной Эвенкии и Восточного Забайкалья.

Объекты, материал и методы исследования

В качестве объектов для исследования выбраны три типичные для Эвенкии популяции лиственницы Гмелина, расположенные в центральной части Среднесибирского плоскогорья в радиусе 25 км от места впадения реки Кочечум в Нижнюю Тунгуску, и одна популяция из Восточного Забайкалья (Читинский лесхоз, Сивяковское лесничество).

Материалом для исследования послужили семена, собранные с отдельных деревьев. Предварительно семена замачивали в дистиллированной воде в течение 24 часов. Затем эндосперм отделяли от зародыша и растирали в 1-2 каплях экстрагирующего буфера: трис-НСI pH 7.5, в который были добавлены β -меркаптоэтанол до 0,15%-й концентрации и тритон X-100 до 1%-й концентрации.

Электрофоретическое разделение экстрактов проводили методом горизонтального электрофореза в 13%-м крахмальном геле в 2-х буферных системах: трис-цитратной pH 6.2 [1], трис-цитратной pH 8.5 / гидроокись лития-боратной pH 8.1 [2]. Составы гелевых и электродных буферов, условия электрофореза в этих системах не отличались от рекомендуемых. В анализ было включено 10 ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G-6-PD, 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD, 1.1.1.44), изоцитратдегидрогеназа (IDH, 1.1.1.42), малатдегидрогеназа (MDH, 1.1.1.37), малик энзим (ME, 1.1.1.40), шикиматдегидрогеназа (SKDH, 1.1.1.25), глутаматдегидрогеназа (GDH, 1.4.1.2), эстераза (EST, 3.1.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, 2.6.1.1) и лейцинаминопептидаза (LAP, 3.4.11.1), кодируемых 17 локусами. Гистохимическое выявление ферментов после электрофореза осуществляли по стандартным прописям [3-5] с некоторыми модификациями. Обозначение ферментов, локусов и аллелей производили по С. Пракашу с соавторами [6]. Нуль аллели обозначали словом null.

Для оценки уровня генетического разнообразия использовали следующие показатели: процент полиморфных локусов при 95%-м (P_{95}) и 99%-м (P_{99}) критериях полиморфности, среднее число аллелей на локус (A_{99}), среднюю наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности, эффективное число аллелей (n_e). Популяционную структуру и степень генетической подразделенности популяций исследовали с помощью F-статистик Райта [7]. Количественную оценку степени генетических различий между популяциями производили по методу, предложенному М. Неи [8]. Для вычисления показателей использовали пакет компьютерных программ PopGen [9].

Результаты

В ходе электрофоретического анализа 10 ферментов в 4-х природных популяциях лиственницы Гмелина из Центральной Эвенкии и Восточного Забайкалья обнаружено 44 аллельных варианта, находящихся под контролем 17 ген-ферментных локусов. Полностью мономорфным во всех включенных в исследование популяциях лиственницы Гмелина оказался лишь локус Mdh-1, остальные локусы (Gdh, G-6pd, Mdh-2, Mdh-3, Mdh-4, Lap-1, Lap-2, Skdh, Est-1, 6-Pgd, Idh, Me-1, Me-2, Got-1, Got-2, Got-3) обнаруживают изменчивость хотя бы в одной из популяций. Семь локусов: G-6pd, Mdh-2, Lap-1, Lap-2, Idh, Me-2, Got-2 являются диаллельными. Еще семь локусов: Gdh, Mdh-3, Skdh, 6-Pgd, Me-1, Got-1, Got-3 имеют по 3 аллеля. В двух локусах: Est-1, Mdh-4 выявлено по 4 аллеля. В локусах Mdh-4, Lap-1, Lap-2 обнаружены аллели, не имеющие фенотипического выражения, так называемые нуль-аллели.

Из приведенных в табл. 1 частот аллелей видно, что наиболее высокий уровень полиморфизма среди полиморфных локусов обнаруживает локус Est-1, наиболее низкий - локусы: Gdh, Mdh-2, Lap-1, Lap-2. Ос-

Таблица 1

Частоты аллелей 17 ген-ферментных локусов в природных популяциях лиственницы Гмелина из Центральной Эвенкии и Восточного Забайкалья

Локус	Аллель	Популяции			
		Эвенкия			Забайкалье
		I	II	III	
Gdh	81	0,042	0,020	-	0,017
	100	0,958	0,980	1,000	0,950
	125	-	-	-	0,033
G-6pd	88	0,146	0,060	0,185	0,333
	100	0,854	0,940	0,815	0,667
Mdh-1	100	1,000	1,000	1,000	1,000
Mdh-2	90	0,021	-	0,018	-
	100	0,979	1,000	0,982	1,000
Mdh-3	93	-	-	-	0,016
	100	0,854	0,700	0,796	0,217
	112	0,1456	0,300	0,204	0,767
Mdh-4	67	-	-	0,037	-
	100	0,958	0,940	0,908	0,950
	122	-	0,040	0,018	0,050
	null	0,042	0,020	0,037	-
Lap-1	100	0,979	0,960	0,963	0,983
	null	0,0201	0,040	0,037	0,017
Lap-2	100	1,000	1,000	0,963	1,000
	null	-	-	0,037	-
Skdh	90	-	-	-	0,050
	100	0,979	0,940	0,982	0,950
	130	0,021	0,060	0,018	-
Est-1	95	0,041	-	-	-
	100	0,688	0,580	0,593	0,767
	108	-	0,060	0,037	-
	115	0,271	0,360	0,370	0,233
6-Pgd	86	-	-	0,018	-
	100	0,938	0,880	0,945	0,933
	121	0,062	0,120	0,037	0,067
Idh	100	0,937	1,000	0,926	0,983
	130	0,063	-	0,074	0,017
Me-1	94	-	-	-	0,067
	100	1,000	1,000	0,963	0,933
	109	-	-	0,037	-
Me-2	100	0,917	0,960	0,944	1,000
	118	0,083	0,040	0,056	-
Got-1	89	-	0,020	0,056	-
	100	1,000	0,940	0,926	1,000
	108	-	0,040	0,018	-
Got-2	100	0,917	0,980	0,926	0,933
	109	0,083	0,020	0,074	0,067
Got-3	71	0,042	0,060	0,148	0,167
	100	0,937	0,940	0,833	0,683
	137	0,021	-	0,019	0,150

тальные локусы (G-6pd, Mdh-3, Mdh-4, Skdh, 6-Pgd, Idh, Got-1, Got-2, Got-3, Me-1, Me-2) характеризуются средним уровнем полиморфизма. Наиболее часто встречающиеся аллели полиморфных локусов являются общими во всех популяциях. Исключение составляет локус Mdh-3. В трех популяциях лиственницы Гмелина из Эвенкии в этом локусе преобладает аллель Mdh-3¹⁰⁰, а в популяции из Восточного Забайкалья аллель Mdh-3¹¹². Различия между популяциями в аллельном составе касаются главным образом более редких аллелей. Например, аллели Gdh¹²⁵, Mdh⁹³ и Skdh⁹⁰ были обнаружены лишь в популяции лиственницы Гмелина из Забайкалья, а аллели 6-Pgd⁸⁶, Mdh-4⁶⁷, Est-1⁹⁵ - только в популяциях из Эвенкии.

На основании аллельных частот 17 ген-ферментных локусов в каждой из исследованных популяций были определены основные показатели генетической изменчивости. Из представленных в табл. 2 данных видно, что значения всех параметров, использованных нами для оценки генетического разнообразия, варьируют в популяциях. Так, процент полиморфных локусов при 95%-ном критерии полиморфности (P_{95}) колеблется в разных популяциях лиственницы от 47,06% до 58,82%, при 99%-ном критерии (P_{99}) - от 70,59% до 88,24%. Среднее число аллелей на локус (A_{99}) изменится от 1,882 до 2,235, наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность - от 0,078 до 0,122 и от 0,111 до 0,147 соответственно.

Таблица 2

Значения основных показателей генетической изменчивости лиственницы Гмелина из Центральной Эвенкии и Восточного Забайкалья

Популяции	P95, %	P99, %	A99	Ho	He	ne
Центральная Эвенкия - I	47,06	76,47	1,882	0,086	0,111	1,150
Центральная Эвенкия - II	47,06	70,59	1,882	0,078	0,115	1,180
Центральная Эвенкия - III	58,82	88,24	2,235	0,111	0,147	1,211
Среднее для Эвенкии	64,70	94,12	2,353	0,092	0,128	1,180
Восточное Забайкалье - YI	58,82	70,59	1,882	0,122	0,140	1,216
Среднее для вида в целом	76,47	94,12	2,588	0,100	0,141	1,210
			*(0,795)	(0,082)	(0,149)	(0,283)

* В скобках даны стандартные отклонения.

Анализ полученных данных показал, что лиственница Гмелина из Эвенкии имеет более низкие по сравнению с лиственницей из Забайкалья средние значения таких важных для характеристики уровня генетической изменчивости показателей, как наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности, эффективное число аллелей ($H_o = 0,092$, $H_e = 0,128$, $n_e = 1,180$ и $H_o = 0,122$, $H_e = 0,140$, $n_e = 1,216$ соответственно). В то же время процент полиморфных локусов и аллельное разнообразие локусов в эвенкийских популяциях лиственницы Гмелина были значительно выше, чем в забайкальской популяции ($(P_{95} = 64,70\%$; $P_{99} = 94,12\%$, $A_{99} = 2,353$ и $P_{95} = 58,82\%$; $P_{99} = 70,59\%$; $A_{99} = 1,882$ соответственно). Среди исследованных в Эвенкии популяций наиболее высокий уровень изменчивости был выявлен в популяции III, в которой преобладают в основном деревья старших возрастных групп. В целом в изученных природных популяциях *L. gmelinii* в полиморфном состоянии находится 76,47% ген-ферментных локусов при 95%-ом критерии полиморфности и 94,12% при 99%-ом критерии. Среднее число аллелей на локус составляет 2,588, наблюдаемая гетерозиготность - 0,100, ожидаемая гетерозиготность - 0,141, эффективное число аллелей - 1,210.

Исследование популяционной структуры и степени генетической подразделенности популяций лиственницы Гмелина с помощью коэффициентов инбридинга особи относительно популяции (F_{is}), инбридинга особи относительно вида (F_{it}) и инбридинга популяции относительно вида в целом (F_{st}) показало, что все проанализированные популяции лиственницы Гмелина испытывают недостаток гетерозиготных генотипов, вызванный инбридингом. Среднее значение показателя F_{is} равно 0,2288, что указывает на 22,88% дефицит гетерозигот у каждой особи относительно популяции. Показатель F_{it} , отражающий инбридинг особи относительно вида, равняется в среднем 0,2897 (табл. 3).

Наиболее значительный дефицит гетерозиготных генотипов наблюдается в эвенкийских популяциях лиственницы. Значение F_{is} для изученных популяций из Эвенкии варьирует от 0,2291 до 0,3269, составляя в среднем 0,2672. Самое высокое значение F_{is} установлено в популяции II пирогенного происхождения, отличающейся от других популяций более молодым возрастным составом. В забайкальской популяции лиственницы Гмелина дефицит гетерозигот значительно ниже - 12,96%.

Большая часть выявленной в популяциях лиственницы Гмелина генетической изменчивости (более 92%) распределяется внутри популяций. На долю межпопуляционного разнообразия приходится 7,89% ($F_{st} = 0,0789$). Полученное значение F_{st} отражает главным образом различия между эвенкийскими популяциями и популяцией лиственницы Гмелина из Забайкалья. Количественная оценка степени генетических различий между популяциями с помощью генетического расстояния D [8] подтверждает это. Наиболее значительные различия по частотам аллелей 17 проанализированных локусов наблюдаются между популяцией лиственницы Гмелина из Забайкалья и популяциями из Эвенкии (табл. 4). Генетическое расстояние D между сравниваемыми парами популяций из этих регионов на порядок выше ($D = 0,0270-0,0343$), чем между популяция-

Значения показателей F_{is} , F_{it} , F_{st}

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}
Gdh	-0,0379	-0,0226	0,0148
G-6pd	0,3444	0,3876	0,0659
Mdh-2	-0,0201	-0,0099	0,0100
Mdh-3	0,1455	0,3728	0,2660
Mdh-4	-0,0556	-0,0441	0,0109
Lap-1	-0,0332	-0,0295	0,0036
Lap-2	-0,0385	-0,0093	0,0280
Skdh	-0,0483	-0,0299	0,0175
Est-1	0,4702	0,4815	0,0214
6-Pgd	0,1962	0,2055	0,0115
Me-1	-0,0594	-0,0204	0,0368
Me-2	0,1519	0,1699	0,0212
Idh	0,2229	0,2429	0,0258
Got-1	0,2582	0,2801	0,0296
Got-2	-0,0762	-0,0650	0,0104
Got-3	0,3651	0,4066	0,0654
Среднее	0,2288	0,2897	0,0789

ми из Эвенкии ($D = 0,0025-0,0042$). Согласно классификации К.В. Крутовского с соавторами [10], такая степень генетической дифференциации (D среднее = 0,030) характерна для различных рас одного вида.

Таблица 4

Генетическое расстояние D между популяциями лиственницы Гмелина из Центральной Эвенкии и Восточного Забайкалья

Популяции	I	II	III
Центральная Эвенкия - I	-		
Центральная Эвенкия - II	0,0042	-	
Центральная Эвенкия - III	0,0025	0,0037	-
Восточное Забайкалье - IV	0,0343	0,0270	0,0291

Полученные данные свидетельствуют о генетической обособленности популяций лиственницы Гмелина из Центральной Эвенкии и Восточного Забайкалья и могут служить обоснованием для выделения их в отдельные внутривидовые таксоны (географические расы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams W.T., Joly R.I. Genetics of allozyme variants in loblolly pine // Heredity. - 1980. - V. 71. - No. 1. - P. 33-40.
2. 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.
3. Brewer G.J. Introduction to isozyme techniques. - N.Y.-L.: Academ. press., 1970. - 186 p.
4. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. - М.: Наука, 1977. - 278 с.
5. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. - Гомель: БелНИИЛХ, 1988. - 68 с.
6. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. IV Patterns of genic variation in central, marginal, and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. - 1969. - V. 61. - P. 841-858.
7. Guries R.P., Ledig F.T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. - 1982. - V. 36. - P. 387-402.
8. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. - 1972. - V. 106. - P. 283-291.
9. Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE Version 1.32: Microsoft Windows based Freeware for Population // Genetic Analysis. - 1999.
10. Крутовский К.В., Политов Д.В., Алтухов Ю.П. и др. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // Генетика. - 1989. - Т. 25. - № 11. - С. 2009-2032.