

УДК 581.4.46(571.51)

А.Н. Лисина
И.Е. Ямских

A.N. Lisina
I.E. Yamskikh

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СИБИРСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ Р. *WALDSTEINIA* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ RAF-PCR АНАЛИЗА

GENETIC VARIATION SIBERIAN POPULATIONS OF GENUS *WALDSTEINIA* ON THE BASIS OF RAF-PCR ANALYSIS

Анализ генетической изменчивости сибирских популяций двух видов р. *Waldsteinia* проведен с помощью RAF-PCR метода. Выявлено, что высокий уровень генетического разнообразия характерен для популяций *Waldsteinia tanzybeica* и популяции *W. ternata*, произрастающей на вырубке под ЛЭП. Анализ степени генетической дифференциации популяций подтверждает самостоятельность вида *Waldsteinia tanzybeica*.

Waldsteinia ternata (Steph.) Fritsch и *W. tanzybeica* Stepanov относятся к числу третичных неморальных реликтов гор Южной Сибири. Вальдштейния тройчатая распространена в лесах Дальнего Востока, Японии, Китая, Хамар-Дабана. Вид *W. tanzybeica* открыт сравнительно недавно Н.В. Степановым (Степанов, 1994) и обитает в северо-восточной части Западного Саяна. От *W. ternata* отличается жизненной формой, размерами и формой листа.

Полевые исследования проведены в мае-июне 2009–2011 гг. в горах Западного Саяна (долина р. Б. Кебеж) и на юго-восточном побережье оз. Байкал (окр. г. Байкальск, пос. Выдрино). Объектом исследований служили 2 популяции *W. tanzybeica* (W1 и W2) и 3 популяции *Waldsteinia ternata* (W3–W5). Цель исследований – оценка генетической изменчивости популяций двух видов р. *Waldsteinia*.

Генетическую вариабельность выявляли с помощью RAF-PCR метода (Randomly Amplified DNA Fingerprinting). Работа выполнена в лабораториях биоинженерии Южно-Сибирского ботанического сада Алтайского государственного университета (г. Барнаул) и молекулярно-генетических методов исследования Сибирского федерального университета (г. Красноярск).

Из каждой популяции было проанализировано по 10 растений. Выделение ДНК производили из 15–25 мг сухой растительной ткани с помощью набора АхуPrep Multisource Genomic DNA (АхуGen, США). RAF-PCR проводили в 12,5 мкл смеси (7,4 мкл H₂O; 1 мкл ДНК; 1,25 мкл 10X-буфера; 1,25 мкл 25 мМ MgCl₂; 1 мкл 10 мМ праймера; 0,5 мкл 20 мМ dNTPs; 0,1 мкл Taq-полимеразы) на амплификаторе MyCycler BioRad с использованием реактивов производства ООО «Медиген» и ООО «СибЭнзим». Амплификацию проводили по следующей программе: 94 °С – 5 мин, 35 циклов: 94 °С – 30 сек, 57 °С – 1 мин, 56 °С – 1 мин, 55 °С – 1 мин, 54 °С – 1 мин, 53 °С – 1 мин; завершающая стадия: 72 °С – 10 мин, охлаждение при 4 °С. Предварительно на 2 образцах ДНК из имеющегося набора праймеров (Waldron et al., 2002) опытным путем был выявлен праймер RAF K-02a (5'-GTCTCCGCAC-3'), который дал воспроизводимый полиморфный результат. После этого ПЦР проводили со всеми образцами. Анализ продуктов амплификации осуществлялся с помощью прибора Experion™ Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad, США).

Результаты вносили в бинарную матрицу для дальнейшей статистической обработки. Обработку результатов анализа проводили с помощью пакета программ TFGA version 1.3 (Miller, 1997) (UPGMA-анализ, бутстреп-тест и расчет генетических дистанций Рейнольда) и Popgene version 1.32 (процент полиморфных локусов (P), показатель подразделенности популяций (Gst). Для оценки внутри- и межпопуляционного разнообразия использовался индекс Шеннона, рассчитанный для каждой популяции (H₀), для суммарной выборки (H_{sp}) и как среднее арифметическое для всех популяций (H_{pop}) (Боронникова и др., 2009).

В пяти изученных популяциях вальдштейнии RAF-PCR анализом выявлено 62 амплифицированных фрагмента ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 100 % (см. табл.1). Размер фрагментов варьирует от 25 до 1500 тпн. Число амплифицированных фрагментов в отдельных популяциях изменяется от 25 до 44. Уровень выявляемого внутривидового полиморфизма варьирует от 40,32 % (W4) до 70,97 % (W1).

Таблица 1

Внутрипопуляционная генетическая изменчивость двух видов *Waldsteinia*

Популяции	Число полиморфных локусов	P, процент полиморфных локусов	Ho, индекс разнообразия Шеннона для популяций
W1	44	70,97	0,3477
W2	33	53,23	0,2759
W3	36	58,06	0,2907
W4	25	40,32	0,2233
W5	43	69,35	0,3338
Все популяции	62	100	0,5200

Максимальные значения внутрипопуляционного генетического разнообразия отмечены для популяций *W. tanzybeica* W1 ($H_0 = 0,35$) и *W. ternata* W5 ($H_0 = 0,33$), произрастающей на вырубке под ЛЭП. Среднее значение индекса Шеннона (H_{prop}) для 5 популяций вальдштейнии составило 0,2943. Индекс Шеннона, рассчитанный для суммарной выборки (H_{sp}) равен 0,52. На долю внутрипопуляционного генетического разнообразия приходится 56,60 %, а на долю межпопуляционного – 43,40 %.

Ожидаемая доля гетерозиготных типов в суммарной выборке ($H_T = 0,35$) значительно выше, чем в субпопуляциях ($H_s = 0,19$). Коэффициент подразделенности популяций для общей выборки (G_{st}) составляет 0,4429. Следовательно, на долю межпопуляционного разнообразия приходится 44,29 %. Таким образом, значения межпопуляционного генетического разнообразия, рассчитанные с помощью индекса Шеннона и коэффициента подразделенности популяций, имеют близкие значения, что подтверждается и другими авторами (Боронникова, Тихомирова, 2008). Высокий уровень межпопуляционной изменчивости свидетельствует о высокой степени дифференциации изученных популяций, которые с большой долей вероятности можно отнести к разным видам.

Дендрограмма сходства популяций на основе RAF-анализа отражает географические принципы кластеризации (рис.). Четко выделяется 2 кластера: первый объединяет байкальские популяции *W. ternata* (W3 и W4), второй – западносаянские *W. tanzybeica* (W1 и W2). Причем узлы ветвления при формировании данных кластеров имеют очень высокую степень поддержки (индекс бутстрепа 99–100 %). Ко второму кластеру примыкает байкальская популяция W5. Значения коэффициента генетической подразделенности популяций (G_{st}) прямо коррелируют с расстоянием между популяциями двух видов, при этом у близко расположенных популяций (W1 и W2; W3 и W4) они минимальны (табл. 2). Исключение составляет обособленно расположенная байкальская популяция W5, произрастающая на вырубке под ЛЭП, фенотипически близкая к виду *W. tanzybeica*, но генетически отличающаяся от изучаемых видов (G_{st} изменяется от 0,3057 до 0,4137).

Таблица 2

Степень генетической дифференциации популяций (G_{st})

Популяции	W1	W2	W3	W4
W2	0,1511	*****		
W3	0,3361	0,3651	*****	
W4	0,3740	0,4064	0,1062	*****
W5	0,2957	0,3917	0,3581	0,4137

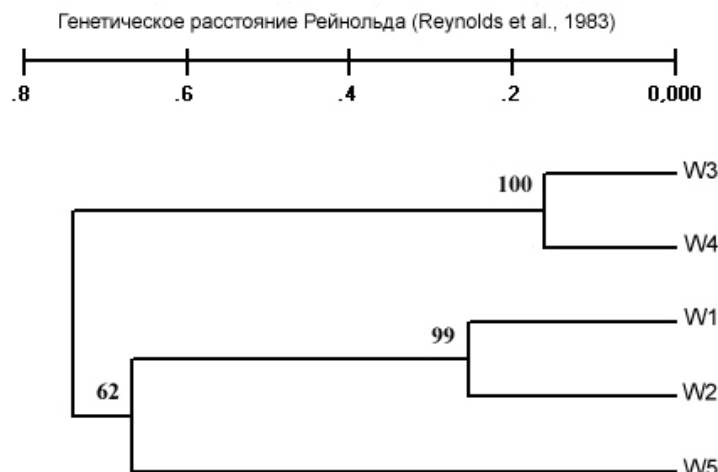


Рис. Дендрограмма сходства популяций двух видов р. *Waldsteinia* на основе RAF-PCR анализа: на дендрограмме цифрами указаны значения бутстрепа (в %)

Таким образом, высокие уровни дифференциации изученных популяций ($G_{st} = 0,4429$) и межпопуляционной изменчивости (43,40 %), на наш взгляд, подтверждают самостоятельность вида *W. tanzybeica*. Западно-сянские популяции вальдштейнии, имеющие явные морфологические различия, характеризуются тенденциями к генетической обособленности. Популяция *W. ternata*, произрастающая на вырубке под ЛЭП, генетически обособлена от двух изучаемых видов и, по-видимому, представляет собой переходную форму.

ЛИТЕРАТУРА

Боронникова С.В., Тихомирова Н.Н., Кравченко О.А. Характеристика генофондов редкого лекарственного вида *Adonis vernalis* L. с использованием ISSR-маркеров // Аграрный вестник Урала, 2009. – № 5.– С. 67–70.

Степанов Н.В. Новый вид рода *Waldsteinia* (*Rosaceae*) из Западного Саяна // Ботан. журн., 1994. – Т. 79, № 9. – С. 109–114.

Miller M.P. 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. 1997.

Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C.C. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance // Genetics. 1983. – Vol.105. – P. 767–779.

Waldron J., Peace C., Searle I. et al. Randomly amplified DNA fingerprinting: a culmination of DNA marker technologies based on arbitrarily-primed PCR amplification // J. Biomed. Biotechn. 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 141–150.

SUMMARY

Analysis of genetic variability in populations of two Siberian species of genus *Waldsteinia* was conducted by RAF-PCR method. Evidences that populations *Waldsteinia tanzybeica* and populations *W. ternata*, which growing on the deforested area under power lines, characterized by high level of genetic diversity. Analysis of genetic differentiation populations confirms that species *Waldsteinia tanzybeica* is independent.