

УДК 575.174:582.739:630*18

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ТЕТРАПЛОИДА *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae)

© 2009 г. А. Б. Холина, О. Г. Корень, Ю. Н. Журавлев

Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток 690022
e-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 24.05.2007 г.

Исследована популяционно-генетическая изменчивость узколокального эндемика западного побережья оз. Ханка (Приморье), автотетраплоидного вида остролодочника ханкайского *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae). Анализ пяти популяций проведен по 28 изоферментным локусам, кодирующим 16 ферментных систем. Существенная аллельная гетерогенность между популяциями обнаружена по 6 из 12 полиморфных локусов. В изученных выборках общей численностью 294 растения гетерозиготность ($H_e = 0.301$) значительно превышает известные средние значения для популяций эндемичных видов (0.076). Полученные данные позволяют выделить две группы популяций остролодочника ханкайского – северную и южную, несмотря на отсутствие выраженного hiatus между ними. Особого внимания заслуживает популяция на косе Пржевальского, которая представляет собой естественный резерв генетического разнообразия вида и является предполагаемым центром образования автотетраплоида *O. chankaensis*.

Многие редкие и эндемичные виды растений существуют в форме малых изолированных популяций, при этом с нарастанием антропогенного воздействия дробление ареала усиливается [1, 2]. Это приводит к уменьшению характерного для популяции уровня панмиксии. В малых популяциях проявляются негативные последствия генетического дрейфа, сопровождающиеся потерей гетерозиготности, фиксацией неблагоприятных аллелей, общим падением уровня изменчивости. С учетом взаимосвязи между эффективной численностью популяции и процессами генетического дрейфа и инбридинга было установлено, что виды с узким ареалом и небольшим числом особей обладают низким уровнем генетического полиморфизма [3, 4]. Но у некоторых редких видов уровень аллозимной изменчивости довольно высок, при этом одним из основных факторов, ответственных за поддержание генетического разнообразия у таких растений, является уровень пloidности [5, 6]. Полиплоидия имела большое значение уже на ранних этапах эволюции растений и в настоящее время широко распространена в растительном мире и выступает в качестве предпосылки для крупномасштабных эволюционных преобразований [7, 8]. По разным оценкам, доля полиплоидов среди покрытосеменных варьирует от 47% [9] до 70% [10]. Принято считать полиплоидию одним из основных способов видообразования у растений [9, 11]. Особенно сильно полиплоидных видов является повышенная гетерозиготность: для аллополиплоидов характерна так называемая “фиксированная гетерози-

готность” за счет объединения двух различных геномов, у автополиплоидов высокий уровень гетерозиготности возникает в результате полисомного наследования и наличия более чем двух аллелей по отдельному локусу [12, 13]. Показателем пример, приведенный в обзоре П. Солтис и Д. Солтиса [6]: при самооплодотворении гетерозиготного автотетраплоида с генотипом aabb ожидается следующее расщепление в потомстве: 1 aaaa : 34 гетерозиготы (различные генотипы) : 1 bbbb, так что количество гетерозигот в этом случае во много раз больше, чем ожидаемое при расщеплении потомства диплоида с дисомным наследованием (1 aa : 2 ab : 1 bb).

Данные анализа изоферментов редкого вида, эндемика западного побережья оз. Ханка (Приморье), остролодочника ханкайского *Oxytropis chankaensis* [14] подтвердили его тетраплоидную природу ($2n = 32$), установленную цитологическими методами [15]. По всем полиморфным локусам было выявлено наличие сбалансированных и несбалансированных гетерозигот во всех возможных сочетаниях, т.е. наблюдалась изменчивость по дозе гена, указывающая на тетрасомное наследование. Для каждого локуса с 3–5 аллозимами были обнаружены гетерозиготные варианты, выявляющие одновременное присутствие трех или четырех аллелей по отдельному локусу, при этом в каждой популяции в среднем 14–18% растений обладали 3–4 аллелями по отдельному локусу [14, 16]. Совокупность таких данных обычно свидетельствует о том, что вид является автотетраплоидом [12, 17, 18]. Показатели поли-

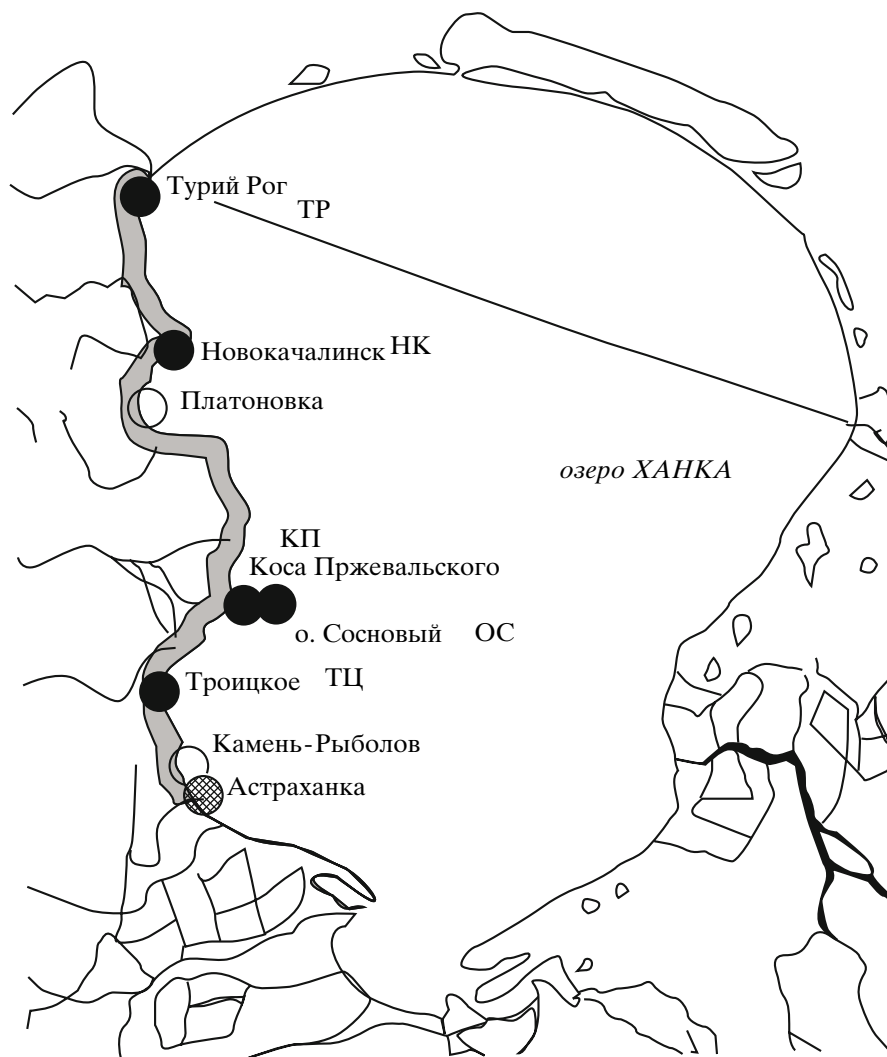


Рис. 1. Географическое распространение *Oxytropis chankaensis* (выделено серым цветом), места сбора материала (●) и пункты, где ранее встречались растения *O. chankaensis*, но в настоящее время не обнаружены (○) или отмечены единичные экземпляры (⊗). Расстояние между исследованными популяциями: ТР-НК – 12.5 км, НК-КП – 31 км, КП-ОС – 1 км, КП-ТЦ – 8.5 км.

морфизма *O. chankaensis* на видовом уровне $P = 48.6\%$, $A = 2$, $A_p = 3.06$, $H_{ob} = 0.173$ [14] оказались существенно выше средних значений, рассчитанных для редких и эндемичных видов [19]. Цель настоящей работы – охарактеризовать разнообразие генофонда отдельных популяций *O. chankaensis*, а также получить представление о генетической структуре автотетраплоидного вида и распределении изменчивости внутри и между популяциями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для анализа изоферментов служили замороженные в жидком азоте листья 294 растений *O. chankaensis* из пяти природных популяций (приведены в соответствии с их расположе-

нием с севера на юг вдоль западного побережья оз. Ханка): с. Турий Рог – ТР (73 растения), с. Новокачалинск – НК (20), коса Пржевальского – КП (118), о-в Сосновый – ОС (35), с. Троицкое – ТЦ (48). Популяции КП и ОС находятся на территории заповедника “Ханкайский” (рис. 1).

Экстракцию, электрофорез и гистохимическое окрашивание изоферментов осуществляли, как описано ранее [14]. Для исследования генетической структуры популяций использовали 16 ферментов, предположительно кодируемых 28 локусами, среди которых идентифицировано 16 мономорфных (*Adh*, *Ald*, *Ce-3*, *Ce-4*, *Fdp* – 2 локуса, *Fe-3*, *Gdh* – 2 локуса, *G-3pdh*, *Gpi-1*, *Hk*, *Idh-1*, *Mdh-4*, *6-pgd* – по 2 локуса) и 12 полиморфных (*Aat*, *Aco*, *Ce-2*, *Fe-1*, *Fe-2*, *Gpi-2*, *Gpt-2*, *Idh-2*, *Lap*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*) генов.

Частоты аллелей рассчитывали на основе уравнения Харди–Вайнберга в популяциях автотетраплоидов [20]: $(p + q)^4 = p^4 + 4p^3q + 6p^2q^2 + 4pq^3 + q^4$. Для автотетраплоида *O. chankaensis* расчет частоты аллеля проводили по формуле: $p_1 = (4N_1 + 3N_2 + 2N_3 + N_4)/4n$, где p_1 – частота аллеля 1, $N_{1,2,3,4}$ – наблюдаемые численности особей с генотипами 1111, 1112, 1122, 1222; n – численность особей в выборке. Для оценки статистической достоверности различий в аллельных частотах по каждому локусу между популяциями использовали χ^2 -тест на гетерогенность с $(k-1)$ степенями свободы (где k – число выборок) [21]. Отклонение фактических частот генотипов от теоретически ожидаемых из соотношения Харди–Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 [22]. В случае с множественными аллелями использовали метод последовательного сведения всего наблюдаемого разнообразия к двухаллельной ситуации: проверяемый аллель (а) – сумма всех остальных аллелей (S) [20]. При случайном и независимом объединении аллелей фенотипы в равновесной популяции должны соответствовать распределению $(pa + pS)^4$ и теоретически при данных частотах аллелей в выборке объема N будут иметь следующие частоты [22]: $N_{e1} = (pa)^4 N$; $N_{e2} = 4(pa)^3 (pS) N$; $N_{e3} = 6(pa)^2 (pS)^2 N$; $N_{e4} = 4(pa) (pS)^3 N$; $N_{e5} = (pS)^4 N$. В теоретически рассчитанном численном распределении фенотипов при необходимости производили объединения классов в соответствии с ограничениями, предусмотренными для метода χ^2 , и сравнивали это распределение с фактическим. Получив значения критерия χ^2 для каждого из аллельных вариантов, далее, учитывая свойство аддитивности χ^2 -распределения, суммировали эти результаты и получали интегральное значение χ^2 , которое сравнивали с критическим для соответствующего суммарного числа степеней свободы [22]. Критические значения критерия χ^2 брали для 5%-ного уровня значимости. Показатели полиморфизма рассчитывали общепринятыми методами [21]. H_{ei} по каждому локусу рассчитывали на основе соотношения Харди–Вайнберга в популяциях автотетраплоидов: $H_{ei} = 1 - \sum p_i^4$, где p_i – частота i -того аллеля данного локуса. Для анализа популяционно-генетической структуры использовали F -статистики Райта [23]. Величину генного потока между популяциями рассчитывали из соотношения: $N_{em} = (1/F_{ST} - 1)/4$ [24]. Генетические дистанции D_N между популяциями рассчитывали по Нею [25]. В качестве алгоритма построения кластеров использован метод невзвешенного парно-группового арифметического усреднения (UPGMA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По каждому полиморфному локусу обнаружено от 2 до 5 аллелей, представленных в популяциях *O. chankaensis* с разной частотой, тест на гетерогенность показал значимые различия по частотам аллелей между популяциями (табл. 1). Пространственное распределение частот аллелей большинства локусов характеризуется мозаичностью. Интересная картина пространственной изменчивости частот аллелей обнаружена по локусу *Mdh-3* – здесь популяции объединяются в “северную” и “южную” группы, и при переходе от севера к югу происходит смена преобладающего аллеля. Для ряда видов растений выявлена корреляция в изменении экологических (климатических, эдафических и др.) условий с частотой того или иного аллелизма [26]. При достаточно выровненных климатических условиях (средней месячной и годовой температуре воздуха, количеству осадков, интенсивности инсоляции) вдоль западного побережья оз. Ханка [27] существует выраженная неоднородность ветрового поля над акваторией озера, особенно в северном и южном его районах. В летний период на юге западного побережья (р-н с. Троицкое) преобладают сильные ветра южного и юго-западного направления, на севере (р-н с. Турий Рог) – ветра южного и юго-восточного направлений. Соответственно такому распределению ветра на юго-западном берегу преобладают сгоны воды, на северо-западном – нагоны [27]. Допустимо предположить, что именно влияние таких факторов, как ветер и сгонно-нагонные явления, приводит к изменению направления векторов отбора в северной и южной части ареала *O. chankaensis*, что выражается в смене преобладающего аллеля у *Mdh-3*. Изменение частоты аллеля между северной и южной группами популяций в сторону уменьшения величины наблюдается для *Aat*², *Ce-2*³, *Gpi-2*³, *Gpt-2*², *Idh-2*², *Lap*² и *Mdh-2*¹; в сторону увеличения – для *Aat*³, *Ce-2*¹, *Idh-2*¹, *Lap*¹ и *Mdh-2*² (табл. 1). Аллель *Aat*¹ появляется только в южной группе. Подобный перепад в частотах аллелей на гипотетической границе между северной и южной группами популяций позволяет предположить, что устойчиво разные направления отбора внутри вида могут быть фактором поддержания пространственной вариабельности частот генов.

При попарном сравнении межпопуляционной аллельной гетерогенности установлено, что между двумя “северными” популяциями ТР и НК гетерогенность незначительная. В наибольшей степени дивергировала от этой группы популяция КП: значимые различия между частотами аллелей КП и ТР обнаружены по семи локусам, КП и НК – по пяти локусам. Между пространственно наиболее удаленными ТР и ТЦ значимые различия обнаружены по трем локусам. В “южной”

Таблица 1. Частоты аллелей полиморфных локусов в популяциях *Oxytropis chankaensis* и тест на гетерогенность (N – число исследованных растений)

Локус	Аллель	Популяция					По виду в целом
		ТР	НК	КП	ОС	ТЦ	
<i>Aat</i>	N	48	17	83	29	44	221
	1	0.000	0.000	0.012	0.017	0.046	0.016
	2	0.224	0.235	0.078	0.104	0.085	0.128
	3	0.641	0.618	0.816	0.741	0.801	0.749
	4	0.135	0.147	0.094	0.138	0.068	0.107
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 18.46$; $d.f. = 4$; $p < 0.01$							
<i>Aco</i>	N	47	10	51	11	32	151
	1	0.117	0.025	0.029	0.023	0.031	0.056
	2	0.883	0.975	0.971	0.977	0.969	0.944
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 8.38$; $d.f. = 4$; $p > 0.05$							
<i>Ce-2</i>	N	45	18	81	15	48	207
	1	0.156	0.139	0.163	0.350	0.328	0.211
	2	0.339	0.361	0.457	0.367	0.313	0.383
	3	0.161	0.222	0.040	0.083	0.036	0.085
	4	0.339	0.278	0.312	0.183	0.276	0.297
	5	0.006	0.000	0.028	0.017	0.047	0.024
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 12.32$; $d.f. = 4$; $0.01 < p < 0.05$							
<i>Fe-1</i>	N	28	10	61	24	29	152
	1	0.045	0.200	0.029	0.031	0.009	0.040
	2	0.464	0.225	0.426	0.396	0.414	0.413
	3	0.411	0.425	0.443	0.448	0.457	0.439
	4	0.071	0.125	0.086	0.104	0.103	0.092
	5	0.009	0.025	0.016	0.021	0.017	0.016
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 0.55$; $d.f. = 4$; $p > 0.05$							
<i>Fe-2</i>	N	22	10	41	18	15	106
	1	0.364	0.275	0.073	0.639	0.500	0.307
	2	0.238	0.275	0.238	0.125	0.067	0.200
	3	0.261	0.225	0.299	0.069	0.033	0.208
	4	0.114	0.225	0.317	0.139	0.317	0.236
	5	0.023	0.000	0.073	0.028	0.083	0.049
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 45.60$; $d.f. = 4$; $p < 0.01$							
<i>Gpi-2</i>	N	72	20	115	31	47	285
	1	0.510	0.575	0.570	0.556	0.596	0.558
	2	0.122	0.050	0.104	0.113	0.144	0.112
	3	0.361	0.375	0.326	0.323	0.250	0.326
	4	0.007	0.000	0.000	0.008	0.011	0.004
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 0.86$; $d.f. = 4$; $p > 0.05$							
<i>Gpt-2</i>	N	49	18	55	30	24	176
	1	0.041	0.055	0.064	0.042	0.136	0.063
	2	0.847	0.917	0.704	0.775	0.781	0.788
	3	0.112	0.028	0.232	0.183	0.083	0.149
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 7.23$; $d.f. = 4$; $p < 0.1$							
<i>Idh-2</i>	N	53	20	100	32	47	252
	1	0.019	0.025	0.083	0.063	0.064	0.059
	2	0.981	0.975	0.917	0.937	0.936	0.941
Тест на гетерогенность: $\chi^2 = 66.89$; $d.f. = 4$; $p < 0.01$							
<i>Lap</i>	N	71	20	110	27	48	276
	1	0.246	0.213	0.286	0.269	0.255	0.264
	2	0.331	0.437	0.305	0.333	0.318	0.326
	3	0.423	0.350	0.409	0.398	0.427	0.410

Таблица 1. Окончание

Локус	Аллели	Популяция					По виду в целом
		ТР	НК	КП	ОС	ТЦ	
Тест на гетерогенность: $\chi^2=2.18$; $d.f. = 4$; $p > 0.05$							
<i>Mdh-1</i>	<i>N</i>	68	20	118	35	48	289
	<i>1</i>	0.651	0.725	0.585	0.579	0.656	0.621
	<i>2</i>	0.316	0.275	0.405	0.407	0.328	0.363
	<i>3</i>	0.033	0.000	0.010	0.014	0.016	0.016
Тест на гетерогенность: $\chi^2=4.56$; $d.f. = 4$; $p > 0.05$							
<i>Mdh-2</i>	<i>N</i>	65	20	118	35	48	286
	<i>1</i>	0.969	0.975	0.830	0.879	0.885	0.887
	<i>2</i>	0.031	0.025	0.170	0.121	0.115	0.113
Тест на гетерогенность: $\chi^2=4.92$; $d.f. = 4$; $p > 0.05$							
<i>Mdh-3</i>	<i>N</i>	65	20	117	35	48	285
	<i>1</i>	0.565	0.700	0.438	0.321	0.401	0.465
	<i>2</i>	0.435	0.300	0.562	0.679	0.599	0.535
Тест на гетерогенность: $\chi^2=21.76$; $d.f. = 4$; $p < 0.01$							
В целом	Тест на гетерогенность: $\chi^2=193.71$; $d.f. = 48$; $p < 0.01$						

Примечание. Частоты мономорфных локусов в таблице не приведены. Отличий по этим локусам между популяциями не обнаружено.

группе между ОС и ТЦ гетерогенность отсутствует, сравнение КП и ОС, КП и ТЦ выявило существенную аллельную гетерогенность.

Анализ генотипов по восьми полиаллельным локусам показал, что из возможных сочетаний по 4 аллеля, включая гомо- и гетерозиготные комбинации, наибольшее число различных генотипов представлено на территории заповедника, в популяции КП, наименее разнообразной является популяция НК. Тем не менее в каждой из пяти популяций обнаружены уникальные генотипы, отсутствующие в других (5 в популяции НК, 7 – ОС, 11 – КП, 13 – ТЦ, 16 – ТР). Уникальные сочетания аллелей встречаются в популяциях с низкой частотой, тем не менее они могут иметь важное значение для сохранения генотипического разнообразия популяций.

Проверка соответствия распределения генотипов соотношению Харди–Вайнберга показала (табл. 2): в локусе *Aco* отклонения отсутствуют, в локусах *Lap* и *Mdh-1* отклонения обнаружены во всех выборках, в остальных локусах отклонения обнаружены в 2–4 выборках и проявляются в дефиците гетерозигот. Дефицит гетерозигот характерен для многих перекрестноопыляемых видов растений, в то время как у самоопыляемых видов наблюдается избыток гетерозигот (А. Brown назвал это явление “парадоксом гетерозиготности” [26]); в числе основных причин дефицита гетерозигот в популяциях обычно называют эффект Валунда, инбридинг, отбор против гетерозигот и влияние дрейфа генов в популяциях с ограниченной численностью [22, 26]. Пространственная структурированность популяций растений, связанная с их территориальным размещением, био-

Таблица 2. Соответствие наблюдаемых численностей генотипов ожидаемым из равновесия Харди–Вайнберга в популяциях *Oxytropis chankaensis*

Локус	Популяция										В сумме по пяти популяциям	
	ТР		НК		КП		ОС		ТЦ			
	<i>d.f.</i>	χ^2	<i>d.f.</i>	χ^2	<i>d.f.</i>	χ^2	<i>d.f.</i>	χ^2	<i>d.f.</i>	χ^2	<i>d.f.</i>	χ^2
<i>Aat</i>	5	19.02	4	10.61	4	48.12	5	2.44*	4	9.43*	22	89.6
<i>Aco</i>	1	0.06*	1	0.12*	1	0.001*	1	0.001*	1	0.01*	5	0.19*
<i>Ce-2</i>	6	51.76	7	30.3	9	58.27	7	8.37*	8	27.59	37	176.3
<i>Fe-1</i>	8	25.31	8	3.99*	9	78.87	7	17.86	7	39.33	39	165.36
<i>Fe-2</i>	7	13.05*	4	4.39*	8	59.95	6	28.9	7	16.09	32	122.38
<i>Gpi-2</i>	5	67.01	3	7.56*	8	82.88	6	14.92	6	19.9	28	192.27
<i>Gpt-2</i>	3	10.6	3	0.001*	5	23.06	3	1.04*	3	0.29*	17	35.5
<i>Idh-2</i>	1	12.58	1	0.81*	1	3.04*	1	0.22*	1	1.38*	5	18.03
<i>Lap</i>	7	339.9	3	18.47	7	276.7	6	76.65	7	139.3	30	851.06
<i>Mdh-1</i>	2	36.9	2	19.4	3	29.4	3	8.57	2	25.16	12	119.4
<i>Mdh-2</i>	1	0.03*	1	0.27*	2	2.08*	1	2.19*	1	8.16	6	12.73
<i>Mdh-3</i>	3	1.55*	2	5.64*	3	16.16	2	5.25*	3	16.7	13	45.32
По всем	49	577.77	39	101.56	60	678.53	48	166.14	50	303.34	246	1828.1

Примечание. *d.f.* – число степеней свободы.

* Наблюдаемые численности генотипов соответствуют ожидаемым.

логией размножения, способами распространения диаспор, широко известна [26]. Для остролодочника ханкайского характерна неравномерность распределения растений, что связано с наличием подходящих мест обитания и способом распространения семян – они могут быть перенесены далеко или остаться вблизи материнского растения. В результате такого “не случайного” распространения семян в популяции возникает подразделенность, происходит генетическое обособление микропопуляций или соседств, что может вызывать дефицит гетерозигот в популяции в целом (эффект Валунда). При этом скрещивание чаще происходит внутри соседств, чем между отдаленными растениями. Вероятность близкородственного скрещивания у остролодочника повышается в связи со стратегией сбора пыльцы у насекомо-опылителя. По нашим наблюдениям, при опы-

лении растений *O. chankaensis* шмели переползают от цветка к цветку на соцветии, пока не посетят все соцветия на растении, затем последовательно посещают близко расположенные растения. В результате происходит распространение пыльцы внутри “семьи” и повышается вероятность бипарентального инбридинга. Именно подразделенность популяций и бипарентальный инбридинг приводят в качестве основной причины дефицита гетерозигот у диплоидных [19] и автотетраплоидных [28, 29] самонесовместимых видов. Влияние эффекта Валунда объясняет 29.8% дефицита гетерозигот (в среднем) в популяциях *O. chankaensis* (дисперсия аллельных частот рассчитана по Ч. Ли [20]).

Нельзя исключить и влияние дрейфа генов на смещение равновесия. Популяции остролодочника, в силу своего произрастания в узкой прибрежной зоне, регулярно испытывают колебания чис-

Таблица 3. Основные показатели аллозимной изменчивости в популяциях *Oxytropis chankaensis*

Популяция	N	$P_{95}, \%$	$P_{99}, \%$	H_o	H_e	A	A_p	n_e	F	s
ТР	73	35.7	42.9	0.247	0.297	1.96	3.25	1.42	0.168	0.288
НК	20	32.1	42.9	0.250	0.273	1.82	2.92	1.36	0.084	0.155
КП	118	39.3	42.9	0.279	0.309	1.96	3.25	1.45	0.097	0.177
ОС	35	39.3	42.9	0.257	0.296	2.00	3.33	1.42	0.132	0.233
ТЦ	48	39.3	42.9	0.273	0.294	2.00	3.33	1.42	0.071	0.133
Среднее по популяциям	59	37.1	42.9	0.261	0.294	1.95	3.22	1.41	0.110	0.197
Для вида	294	42.9	42.9	0.266	0.301	2.00	3.33	1.43	0.116	0.208

Примечание. N – количество исследованных растений, $P_{95}, P_{99}, \%$ – полиморфность с учетом 95 и 99%-го критерия, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, A – количество аллелей на локус, A_p – количество аллелей на полиморфный локус, n_e – эффективное число аллелей, F – индекс фиксации, s – доля инбредного потомства.

ленности, иногда довольно резкие, например, вследствие повышения уровня воды в озере или в результате значительных повреждений береговой линии после таяния льда. Так, при исследовании плотности популяций ТР и КП в 2002–2003 гг. нами было обнаружено, что за год плотность популяции ТР уменьшилась с 14.2 до 5.07 растений на кв.м, КП – с 38.6 до 25.6 растений на кв.м. Эти регулярные “локальные экологические катастрофы”, вызывающие изменение численности, могут приводить к отклонению от равновесного состояния популяций. В то же время известно, что для возвращения популяции автотетраплоидов в равновесное состояние необходимо не одно, как в случае с диплоидами, а несколько поколений свободного скрещивания [7, 20]. Очевидно, что динамика частот аллелей и генотипов имеет комплексную природу. Перечисленные факторы не являются взаимоисключающими, и каждый из них может вносить свой вклад в создание дефицита гетерозигот. Кроме указанных причин, в популяциях автотетраплоидов доля гомозигот может увеличиваться вследствие так называемой двойной редукции, или случайной сегрегации хроматид, когда сестринские хроматиды в результате кроссинговера и последующего распределения хромосом попадают в одну гамету [7, 20].

Уровень генетической изменчивости, выраженный через показатели гетерозиготности, является весьма высоким. Средняя наблюдаемая гетерозиготность по полиморфным локусам варьирует от 0.576 в популяции ТР до 0.651 в популяции КП и составляет в среднем 0.62; средняя ожидаемая гетерозиготность – от 0.637 в популяции НК до 0.721 в популяции КП и составляет в среднем 0.702. Наиболее высокие показатели средней наблюдаемой (0.279) и ожидаемой (0.309) гетерозиготности по всем 28 локусам также отмечены в популяции КП.

На основе данных по частотам аллелей 28 генов были рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма, отражающие уровень

изменчивости в популяциях остролодочника (табл. 3). Наиболее высокими показателями характеризуются популяции КП и ТЦ, в “северных” популяциях (ТР и НК) показатели изменчивости ниже. Доля инбредного потомства s для вида составляет 0.208, т.е. до 20% особей данного вида появились в результате естественного (для *O. chankaensis* – бипарентального) инбридинга. Очевидно, что популяции остролодочника обладают необычайно высоким для редкого эндемичного вида уровнем изменчивости. Значение показателя ожидаемой гетерозиготности ($H_e = 0.301$) превышает среднее значение для популяций эндемичных видов ($H_e = 0.076$) [19]. По литературным данным для 23 видов автополиплоидов, величины H_e около 0.300 встречались у немногих видов: трех видов рода *Galium* [30], *Ranunculus cassubicus* [28] и *Thymus loscosii* [18]. Среднее значение наблюдаемой гетерозиготности, близкое показателям *O. chankaensis* ($H_o = 0.266$), даже среди автополиплоидов встречалось редко – у *Tolmiea menziesii* $H_o = 0.237$ [31] и у *Vaccinium oxycoccus* $H_o = 0.213$ [17]. Установленный высокий уровень генетического разнообразия *O. chankaensis* обусловлен в первую очередь особенностями биологии и системы размножения вида: самонесовместимость и перекрестное опыление с помощью насекомых и значительная продолжительность жизни особей, которая приводит к наличию перекрывающихся поколений и увеличивает эффективную численность популяций [16]. В то же время для автотетраплоидов решающим фактором, ответственным за наблюдаемый уровень полиморфизма, является тетрасомный тип наследования [17, 18, 31]. В случае с *O. chankaensis* существенный вклад в поддержание полиморфизма вносит не только тетрасомное наследование, но и история формирования автотетраплоидного генома: данные анализа изоферментов указывают на возникновение автополиплоида *O. chankaensis* путем слияния нередуцированных гамет в ходе многократных скре-

Таблица 4. Анализ генного разнообразия и подразделенности пяти популяций *Oxytropis chankaensis* по 12 полиморфным локусам

Локус	H_O	H_S	H_T	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
<i>Aat</i>	0.548	0.661	0.683	0.167	0.188	0.025	0.032
<i>Aco</i>	0.192	0.197	0.220	0.023	0.054	0.032	0.100
<i>Ce-2</i>	0.802	0.963	0.969	0.167	0.188	0.026	0.006
<i>Fe-1</i>	0.967	0.931	0.934	-0.025	-0.012	0.013	0.003
<i>Fe-2</i>	0.689	0.946	0.985	0.274	0.329	0.076	0.040
<i>Gpi-2</i>	0.856	0.889	0.891	0.039	0.045	0.006	0.002
<i>Gpt-2</i>	0.523	0.592	0.616	0.127	0.151	0.028	0.039
<i>Idh-2</i>	0.206	0.212	0.220	0.134	0.144	0.011	0.036
<i>Lap</i>	0.565	0.955	0.956	0.408	0.410	0.003	0.001
<i>Mdh-1</i>	1.000	0.827	0.834	-0.212	-0.202	0.008	0.008
<i>Mdh-2</i>	0.350	0.364	0.378	0.045	0.077	0.034	0.037
<i>Mdh-3</i>	0.744	0.843	0.871	0.116	0.150	0.039	0.032
В среднем	0.620	0.702	0.713	0.105	0.127	0.025	0.028

Примечание. H_O – усредненная выборочная наблюдаемая гетерозиготность; H_S – усредненная выборочная ожидаемая гетерозиготность; H_T – общее генное разнообразие; F_{IS} – коэффициент инбридинга особи относительно выборки; F_{IT} – коэффициент инбридинга особи относительно всего вида в целом; F_{ST} – коэффициент инбридинга выборки относительно всего вида (межвыборочная компонента изменчивости); G_{ST} – относительная генная дифференциация между всеми выборками.

щиваний растений, имеющих разные гаплотипы [14, 16].

Оценка степени подразделенности популяций на основе коэффициентов инбридинга Райта и подразделенности по Нею свидетельствует, что на межпопуляционную изменчивость у остролодочника приходится 2.5% от выявленной генетической изменчивости (табл. 4). В целом каждая отдельная популяция остролодочника поддерживает до 97% генетической изменчивости вида. Поток генов между популяциями остролодочника достаточно велик ($N_e m = 9.75$), чтобы не позволять накапливаться генным различиям. Пространственное распределение генетического разнообразия обычно формируется под влиянием разнонаправленного воздействия потока генов, генетического дрейфа и отбора [22, 24]. При этом необходимо учитывать, что установленный на основе показателей подразделенности уровень потока генов не обязательно существует в настоящее время, а может лишь отражать поток генов, необходимый для формирования наблюдаемой картины распределения аллельных частот. Иными словами, низкий уровень дифференциации может быть в равной степени обусловлен как текущим потоком генов, так и недавним расхожде-

нием популяций. У *O. chankaensis* интенсивный обмен генами происходит путем распространения пыльцы и семян. В распространении пыльцы важную роль играют высокая фертильность и большое количество пыльцевых зерен, длительный период цветения растения и продолжительность жизни отдельного цветка; при распространении семян важны “плаваемость” плодов, их способность к переносу ветром и водой [16]. Известно, что при наличии гидрохории уровень межпопуляционной изменчивости довольно низкий, как показано для *Hibiscus moscheutos* – $F_{ST} = 0.003$ [32]. Кроме того, у автотетраплоидного вида поток генов, выражаемый через количество мигрантов, включает в 2 раза больше генов, чем у диплоидов (через пыльцу переносится $2n$ геном, через семена – $4n$ геном), что также способствует гомогенизации популяций. Слабая межпопуляционная подразделенность при высокой внутривидовой изменчивости характерна для автотетраплоидов – так, для *Iris cristata* $F_{ST} = 0.018$ [33], для *Pilosocereus lanuginosus* $G_{ST} = 0.009$ [29]. Низкие значения показателей подразделенности у автотетраплоида *O. chankaensis* могут быть обусловлены именно тетраплоидным типом наследования, так как известно, что полисомное наследова-

Таблица 5. Генетическое сходство между популяциями *Oxytropis chankaensis*

Популяция	ТР	НК	КП	ОС	ТЦ
ТР		0.005	0.008	0.010	0.007
НК	0.9952		0.013	0.017	0.008
КП	0.9918	0.9871		0.018	0.007
ОС	0.9900	0.9832	0.982		0.001
ТЦ	0.9932	0.9919	0.9928	0.9986	

Примечание. Под диагональю – значения коэффициента генетического сходства по М. Нею (I_N), над диагональю – генетической дистанции (D_N).

ние ослабляет негативное влияние генетического дрейфа [17, 34]. Для видов бобовых отсутствие выраженной внутривидовой дифференциации объясняют особенностями их биологии [35] – значительной продолжительностью жизни, ранним возрастом первой репродукции, а также способностью к быстрому росту популяции через мощную продукцию семян, что в определенной мере можно отнести и к *O. chankaensis* [16]. Таким образом, высокие темпы обмена генами в сочетании с тетрасомным наследованием и особенностями биологии вида приводят к формированию слабоподразделенной структуры *O. chankaensis*.

Коэффициент генетической дистанции D_N , отражающий степень межпопуляционной дифференциации, варьировал в пределах от 0.005 между популяциями ТР и НК до 0.018 между КП и ОС (табл. 5), составляя в среднем 0.009. Рассчитанные величины находятся в интервале средних значений для конспецифичных популяций растений $D_N = 0.000–0.045$ [36]. Значения генетических дистанций *O. chankaensis*, как и показателей подразделенности, свидетельствуют о низкой степени дивергенции популяций. Тем не менее установленная гетерогенность популяций, наличие уникальных генотипов в каждой из них и кластеризация популяций (рис. 2) отражают их генетическое своеобразие, несмотря на то, что межпопуляционные различия имеют относительно небольшую величину.

С учетом этого мы исследовали генное разнообразие и популяционную структуру остролодочника ханкайского, рассматривая две группы популяций: северную (ТР и НК) и южную (КП, ОС, ТЦ), как две отдельные популяции (табл. 6). Величина общего (H_T) и средневыворочного (H_S) генного разнообразия в южной группе выше, чем в северной, примерно на 3%, средней выворочной наблюдаемой гетерозиготности (H_O) – на 6%. Более высокие показатели изменчивости в южной группе могут быть связаны с заповедным режимом большей части данной территории (КП, ОС). Различия между двумя группами популяций выявляют также показатели F -статистики: уровень инбридинга особи относительно отдельной популяции (F_{IS}) и всей группы (F_{IT}) почти в 2 раза выше в северной группе, для которой дефицит гетерозигот в популяциях и группе в целом составляет около 16%. Подразделенность популяций в обеих группах слабая, но в южной показатель подразделенности (F_{ST}) несколько выше. Величина потока генов (N_{em}) в северной группе в 1.5 раза превышает таковую в южной. Очевидно, для северной группы характерны снижение аллозимной изменчивости, увеличение вероятности близкородственного скрещивания, более интенсивный обмен генами и слабая дифференциация популяций. В южной группе популяции более дифференцированы, уровень генетического разнообразия выше, уровень инбридинга слабее.

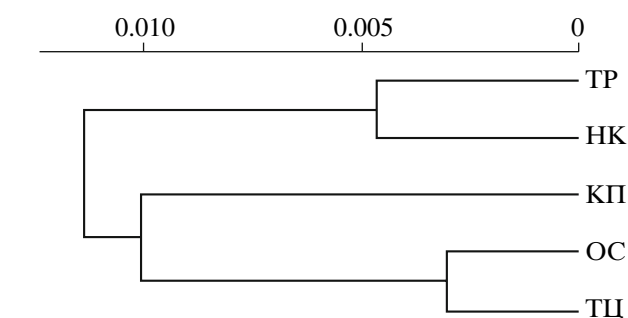


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе коэффициентов генетической дистанции Нея, показывающая степень генетической дифференциации между популяциями *O. chankaensis*. Расположение популяций дано на рис. 1.

Таким образом, проведенные исследования позволяют оценить состояние генофонда автотетраплоида остролодочника ханкайского и охарактеризовать его внутривидовую структуру. Полученные данные демонстрируют генетическую

Таблица 6. Анализ генного разнообразия и подразделенности двух групп популяций *Oxytropis chankaensis* по 12 полиморфным локусам

Группа	H_O	H_S	H_T	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}	N_{em}
Северная	0.579	0.680	0.684	0.157	0.163	0.009	0.008	27.5
Южная	0.639	0.706	0.713	0.082	0.093	0.014	0.008	17.6

Примечание. См. примечание к табл. 4; N_{em} – генный поток.

обособленность северной и южной групп популяций, несмотря на отсутствие выраженного хиатуса между ними. Уровень аллозимного полиморфизма *O. chankaensis* весьма высок против ожидаемого для узколокального эндемичного редкого вида, в том числе и автотетраплоидного. Особого внимания заслуживает популяция на косе Пржевальского, где выявлено наибольшее число генотипов с разнообразным сочетанием аллелей, отмечено довольно много уникальных генотипов и показана максимальная гетерозиготность. Допустимо предположить, что установленный именно здесь центр разнообразия вида может быть и вероятным центром образования вида, причем высокий уровень гетерозиготности, наблюдаемый у нынешних полиплоидов, мог сложиться в результате массовых скрещиваний разнообразных предковых диплоидных форм и последующего перехода “гибридов” на полиплоидный уровень. Разнообразие генотипов в предполагаемой точке происхождения популяций может иметь решающее значение для предотвращения негативных последствий, связанных с сокращением численности изолированных популяций *O. chankaensis*, и представляет собой естественный резерв для адаптации и эволюционных преобразований вида. Кроме того, эта популяция вызывает интерес как источник материала для реинтродукции.

Работа поддержана грантами НШ 6923-2006.4 Президента Российской Федерации, программами Президиума РАН “Динамика генофондов растений, животных и человека” (№ 10002-251/П-24/154-392/290404-169) и “Научные основы сохранения биоразнообразия России” (№ 04-1-П12-033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kruckeberg A.R., Rabinowitz D. Biological aspects of endemism in higher plants // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1985. V. 16. P. 447–479.
2. Schemske D.W., Husband B.C., Ruckelshaus M.N. et al. Evaluation approaches to the conservation of rare and endangered plants // Ecology. 1994. V. 75. P. 384–606.
3. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 1989. P. 43–63.
4. Ellstrand N.C., Elam D.R. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1993. V. 24. P. 217–242.
5. Clegg M.T., Brown A.H.D. The founding of plant populations // Genetics and conservation. Menlo Park, California: Benjamin-Cummings, 1983. P. 216–228.
6. Soltis P.S., Soltis D.E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 7051–7057.
7. Савченко В.К. Генетика полиплоидных популяций. Минск: Наука и техника, 1976. 240 с.
8. Ramsey J., Schemske D.W. Pathway, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plant // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1998. V. 29. P. 467–501.
9. Грант В. Видообразование у растений. М.: Мир, 1984. 528 с.
10. Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms // Science. 1994. V. 264. P. 421–424.
11. Stebbins G.L. Polyploidy in plants: unresolved problems and prospects // Polyploidy. N. Y.: Plenum, 1980. P. 495–520.
12. Soltis D.E., Rieseberg L.H. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis // Amer. J. Bot. 1986. V. 73. P. 310–318.
13. Arft A.M., Ranker T.A. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis* // Amer. J. Bot. 1998. V. 85. P. 110–122.
14. 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. Т. 40. № 4. С. 497–505.
15. Гурзенков Н.Н., Павлова Н.С. Хромосомные числа представителей родов *Astragalus* и *Oxytropis* (Fabaceae) с Дальнего Востока СССР // Бот. журн. 1984. Т. 69. № 11. С. 1569–1570.
16. Холина А.Б. Изменчивость и структура популяций остролодочника ханкайского *Oxytropis chankaensis* Jurtz.: Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 2005. 199 с.
17. Mahy G., Bruederle L.P., Connors B. et al. Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccus* (Ericaceae) // Amer. J. Bot. 2000. V. 87. P. 1882–1889.
18. Lopez-Pijol J., Bosch M., Simon J., Blanche S. Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae) // Ann. Bot. 2004. V. 93. P. 323–332.
19. Godt M.J.W., Johnson B.R., Hamrick J.L. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species // Conservation Biol. 1996. V. 10. P. 796–805.
20. Лу Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978. 555 с.
21. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. ВИНТИ АН СССР. Общая генетика. 1983. Т. 8. С. 76–104.
22. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
23. Wright S. The genetical structure of population // Ann. Eugen. 1951. V. 15. P. 323–354.
24. Slatkin M. Gene flow in natural populations // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1985. V. 16. P. 393–430.
25. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V. 106. № 949. P. 283–292.
26. Brown A.H.D. Enzyme polymorphism in plant population // Theor. Population Biol. 1979. V. 15. P. 1–42.
27. Васильковский М.Г. Гидрологический режим озера Ханка. Л.: Гидрометеиздат, 1978. 176 с.

28. Horandl E., Greilhuber J. Diploid and autotetraploid sexuals and their relationships to apomicts in the *Ranunculus cassubicus* group: insights from DNA content and isozyme variation // Plant Syst. Evol. 2002. V. 234. P. 85–100.
29. Nassar J.M., Hamrick J.L., Fleming T.H. Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae) // Amer. J. Bot. 2003. V. 90. P. 1628–1637.
30. Ehrendorfer F., Samuel R., Pinsker W. Enzyme analysis of genetic variation and relationships in diploid and polyploid taxa of *Galium* (Rubiaceae) // Pl. Syst. Evol. 1996. V. 202. P. 121–135.
31. Soltis D.E., Soltis P.S. Genetic consequences of autopolyploidy in *Tolmiea* (Saxifragaceae) // Evolution. 1989. V. 43. P. 586–594.
32. Kudoh H., Whigham D.F. A genetic analysis of hydrologically dispersed seeds of *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) // Amer. J. Bot. 2001. V. 88. P. 588–593.
33. Hannan G.L., Orick M.W. Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae) // Amer. J. Bot. 2000. V. 87. P. 293–301.
34. Moody M.E., Mueller L.D., Soltis D.E. Genetic variation and random drift in autotetraploid populations // Genetics. 1995. V. 134. P. 649–657.
35. Godt M.J.W., Hamrick J.L. Genetic variation in *Lathyrus latifolius* (Leguminosae) // Amer. J. Bot. 1991. V. 78. P. 1163–1171.
36. Crawford D.J. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies // Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1983. P. 257–287.

Genetic Structure and Differentiation of Populations of the Tetraploid Species *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae)

A. B. Kholina, O. G. Koren', and Yu. N. Zhuravlev

*Institute of Biology and Soil Sciences, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;
e-mail: kholina@biosoil.ru*

The population genetic variation of the tetraploid species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae), a local endemic of the western coast of Khanka Lake (Primorye), was examined. Five populations were analyzed using 28 isozyme loci encoding 16 enzyme systems. Significant allelic heterogeneity among the populations was found for six out of twelve polymorphic loci. The heterozygosity of the samples (total sample size 294 plants) $H_e = 0.301$ was considerable higher than the mean values in populations of endemic species (0.076). Based on the results of this study, we identified two groups of *O. chankaensis* populations (southern and northern), in spite of the absence of marked hiatus between them. Of special interest is the population from Przhewalski Spit, which is a natural reserve of genetic diversity of the species and the putative center of formation of the autotetraploid *O. chankaensis*.