

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ У СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ: ДАННЫЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Петрова Е.А.¹, Горошкевич С.Н.¹, Политов Д.В.²

¹ Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, 634055, Томск, пр. Академический, 10/3.

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3. petrova@imces.ru

*Изучение распределения генетического разнообразия у сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) проведено с использованием изоферментных генетических маркеров. Объектами исследования были 15 экотипов, представляющие широтный, долготный и высотный профили ареала вида. С помощью электрофореза изоферментов вегетативных тканей (почек) в крахмальном геле установлены генотипы 250 клонов по 26 локусам, кодирующим 16 ферментных систем. Выявленные закономерности в структуре аллельного состава и значительная степень подразделенности экотипов сосны кедровой сибирской свидетельствуют об отзывчивости генетической структуры вида на изменчивость экологических факторов и географическую разобщенность популяций. Изоферментные локусы, по которым генетическая подразделенность экотипов выше средней, предположительно имеют селективное значение.*

ВВЕДЕНИЕ

Сосна кедровая сибирская, или кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour) - один из основных эдификаторов лесных экосистем бореальной зоны Евразийского континента. Семена сибирского кедра распространяются европейской кедровкой (*Nucifraga caryocatactes*). Кедровые орехи обладают высокими питательными и вкусовыми качествами, служат пищей многих представителей фауны лесных экосистем, заготавливаются местным населением и профессиональными заготовителями в промышленных масштабах. Территория лесов с участием кедра сибирского составляет около 36,69 млн. га (Iroshnikov, Politov, 2004). Северная граница распространения кедра проходит в районе р. Средняя Печора, низовий Оби, Надыма, Красноселькупа и Игарки, т.е. практически достигает Северного полярного круга. Южная граница ареала вида представлена изолированными местообитаниями в Монгольском Алтае, Юго-Восточном Хангае и Юго-Западном Хэнтэе (46°40'-47°00' с.ш.). Распространение кедра сибирского на восток ограничено холодными почвами вечной мерзлоты и сухим резко континентальным климатом. В Забайкалье ареал кедра перекрывается с ареалом кедрового стланика (*Pinus pumila* Pallas. Regel), родственного ему вида кедровых сосен. На западе ареал кедра ограничен распространением ели и сосны (в бассейне Северной Двины и Печоры), а также пихты (в Среднем и Южном Предуралье), которые более конкурентоспособны в условиях достаточного увлажнения и обедненных почв, и затеняют кедр, не позволяя ему выйти в первый ярус и сформировать генеративное поколение (Семечкин и др., 1985). В горах южной Сибири кедр сибирский формирует высотную границу лесной растительности (Огуреева, 1980), образуя формы, отличные от типичной формы дерева с симметричной кроной («стланиковые», «юбочные» и т.д.). Высокая экологическая пластичность кедра сибирского, его биосферная и ресурсная ценность делают актуальным изучение географической структуры генофонда этого вида.

Целью нашего исследования являлось изучение распределения аллозимной изменчивости в популяциях сосны кедровой сибирской, характеризующих широтный, долготный и высотный профили ареала вида.

Изучение аллозимной изменчивости в популяциях сосны кедровой сибирской проводится с конца 80 годов XX века. За этот период были разработаны методы проведения электрофореза и гистохимического окрашивания изоферментов, описаны системы генетического контроля изоферментов у *Pinus sibirica* (Крутовский и др., 1987, Политов, 1989), проанализирована генетическая структура, подразделенность и дифференциация ряда популяций (Крутовский и др., 1989, Krutovskii et al., 1992, Politov, Krutovskii, 2004), описана

система скрещивания в популяциях вида (Политов, Крутовский, 1990). Полученные нами результаты, с одной стороны, дополняют сведения о геогеографии данного вида, с другой – являются целостным, законченным исследованием распределения изменчивости аллозимных локусов в ареале сосны кедровой сибирской.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основой проведенных исследований послужил клоновый архив видов и экотипов *Pinus* из подрода *Strobus*, созданный сотрудниками лаборатории дендрэкологии ИМКЭС СО РАН. В анализ включены 15 экотипов кедровой сосны сибирской. Экотипы Уренгой (У), Тарко-Сале (ТС), Ноябрьск (Нб), Стрежевой (Стр), Виссарионов Бор (ВБ), Баталино (Б) и Абаза (А) представляют широтный профиль (65°50' - 52°30' с.ш.) ареала, экотипы Невьянск (Нв), Баталино, Тайшет (Т), Слюдянка (С) и Северобайкальск (Сб) - долготный профиль (60°10'-109°25' в.д.) и экотипы Абаза (А), Он1, Он2, Он3 и ЗСП, исходный материал которых собран на различных высотах в горах Западного Саяна составляют высотный (350-2050 м. над ур.м.) профиль. При создании клонового архива вегетативный материал (черенки) собирался с взрослых, достигших репродуктивного возраста деревьев исходных насаждений, характеризующих адаптированную к местным условиям произрастания структуру популяции. Поэтому в нашем исследовании экотипы выступают смысловым аналогом популяций (выборок).

Для электрофореза использовались диплоидные вегетативные ткани (почки), хранившихся при +4°C. Ткани гомогенизировались механически в экстрагирующем буфере (0,05 М трис-НСl, рН 7,7 добавлением растворимого поливинилпирролидона (3%), β-меркаптоэтанола (0,05%) и поликлара в объеме, равном объему пробы). Электрофорез проводился в 13%-м крахмальном геле. Электрофоретическое разделение каждого образца проводилось в двух буферных системах: морфолин-цитратной, рН 7,8 и трис-ЭДТА-боратной, рН 8,6. Генный контроль изоферментных систем в целом не отличался от описанного ранее для сосны кедровой сибирской и близких видов сосен секции *Strobus* (Крутовский и др., 1987, Politov et al., 1999, Белоконь и др., 2005). Гистохимическое окрашивание проводили согласно стандартным методикам с незначительными модификациями (Manchenko, 1994).

На основании полученных генотипов были определены частоты аллелей изученных изоферментных локусов, а также рассчитаны основные параметры генетической изменчивости: ожидаемая гетерозиготность (H_e), наблюдаемая гетерозиготность (H_o), доля полиморфных локусов (P), среднее число аллелей на локус. Обработка генетических данных проведена в пакете GenAlEx V5.1 (Peacal, Smouse 2001), многомерный анализ проведен в пакете Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлены генотипы 250 клонов по 26 локусам, кодирующим 16 ферментных систем. В целом для вида доля полиморфных локусов составила 53%, среднее число аллелей на локус 1,92, средняя наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность 0,107 и 0,113 соответственно. Полностью мономорфными оказались локусы *Gdh*, *Got-1*, *Got-3*, *Mdh-1*, *6Pgd-1*, *6Pgd-3*, *Pgi-1*, *Pgm-2*, *Sod-2*, *Sdh*, *Mnr* и *Perca*. К слабо полиморфным можно отнести локусы *Fdh*, *Lap-2*, *Mdh-2*, *6Pgd-2* и *Skdh-2*, частота встречаемости редких аллелей по которым в среднем для вида не превышает 5%. Редкий аллель по локусу *Lap-2* встречается только в популяции Баталино и Западно-Саянских выборках за исключением ЗСП. Практически только в гетерозиготах встречаются альтернативные часто встречающемуся аллели по локусам *Fdh* и *Mdh-2*. Разнообразие по локусу *6Pgd-2* представлено единичными гетерозиготами, обнаруженными в северных популяциях Тарко-Сале и Стрежевой. Также на низких частотах в гетерозиготном состоянии встречается редкий аллель по локусу *Skdh-2*,

единственная гомозигота по этому аллелю обнаружена в популяции Баталино. Локусы Adh-1, Fe-2, Lap-3, Pgi-2, Pgm-1, Skdh-1 и Sod-4 более полиморфны, характеризуются большими частотами альтернативных аллелей и разнообразием генотипов. В целом по полиморфным локусам (за исключением Fe-2) наиболее распространенные аллели оказались общими для изученных популяций.

Широкая географическая представленность в нашем исследовании экотипов *Pinus sibirica* сделала возможным анализ зависимости частоты аллелей полиморфных локусов от географического положения популяций. Обнаружена достоверная зависимость частоты аллелей по локусам Fe-2, Pgm-1, Skdh-1, Skdh-2, Sod-3 и Sod-4 от широты, на которой располагается популяция. Долготное положение популяции оказывает влияние на частоту аллелей по локусам Fe-2, Pgm-1, Mdh-2, Sod-3 и Sod-4. Увеличение частоты встречаемости в северном направлении и уменьшение - в восточном характерно для быстрых аллелей локусов Sod-3 и Sod-4 и второго по подвижности аллеля локуса Pgm-1. Сложную географическую структуру имеет распределение аллелей локуса Fe-2. От максимально удаленных на север популяций до центрального района происходит плавное увеличение частоты аллеля, кодирующего второй по электрофоретической подвижности аллозим, в южной и восточной частях ареала этот аллель преобладает, а в популяции Невьянск, характеризующей западную границу распространения вида, с частотой 0,75 встречается альтернативный, более быстрый вариант. Также можно отметить закономерное уменьшение частоты быстрого аллеля локусов Fe-2 и Pgi2 с уменьшением высоты Западно-Саянских выборок.

На основании частот встречаемости аллелей и генотипов по изоферментным локусам были рассчитаны основные параметры генетической изменчивости в изученных популяциях сосны кедровой сибирской. Доля полиморфных локусов варьирует от 31% на восточной границе распространения (популяция Сб) до 50% в выборке из среднегорной западно-Саянской популяции. Те же популяции характеризуются минимальным и максимальным средним числом аллелей на локус. Максимальная наблюдаемая гетерозиготность наблюдается популяциях, произрастающих на территории Томской области (Баталино и Стрежевой) - около 13% генов деревьев данных выборок находятся в гетерозиготном состоянии. В среднем менее чем по 8% генов гетерозиготны деревья сосны кедровой сибирской на границе распространения вида в горах Западного Саяна. Средняя ожидаемая гетерозиготность популяции увеличивается с возрастанием широты местности. Повышенными значениями ожидаемой гетерозиготности отличаются выборки Стрежевой и Баталино, в то время как расположенные южнее западно-саянские популяции и популяции, представляющие восточную часть ареала характеризуются более низкими значениями. Таким образом, минимальный уровень генного разнообразия отмечается по окраинам ареала, из которых в этом отношении особенно выделяется юго-восточная; максимальный – смещен к северо-западу от географического центра ареала. Среди выборок, характеризующих высотный профиль, максимальные значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, а также среднего числа аллелей на локус характеризуется выборка из долины реки Большой Он, находящаяся на границе средней и верхней части лесного пояса.

Анализ F_{ST} статистик показал, что изоферментные локусы вносят различный вклад в генетическую подразделенность популяций сосны кедровой сибирской. По отдельным локусам значения F_{ST} варьировали от 0,032 (Pgi-2) до 0,234 (Fe-2). В среднем, по нашим данным, у сосны кедровой сибирской на долю межпопуляционной изменчивости приходится 7,8% общей генетической изменчивости. Это несколько выше ранее полученных оценок данного параметра – 2,5% (Крутовский и др., 1989), 3% (Podogas, 1993), 4% (Гончаренко, Силян, 1997), 6,3% (Politov, 1998). Предположительно, это может быть связано с увеличением числа проанализированных локусов вместе с более широким представителем различных экотипов в исследуемой совокупности популяций. Значительный разброс значений F_{ST} может свидетельствовать о том, что не все проанализированные нами локусы селективно нейтральны. Ранее высказывалось мнение, что локусы со средними значениями F_{ST} являются нейтральными, с более низкими - подвержены

балансирующему отбору, а с более высокими - дизруптивному (Алтухов, 2003, Динамика..., 2004). В нашем исследовании наиболее высокие значения F_{ST} характерны для локусов, структура изменчивости которых связана с географическим расположением популяций (Fe-2, Sod-4, Pgm-1). Это позволяет предположить, что изменчивость данных локусов является адаптивным ответом популяций сосны кедровой сибирской на определенные климатические и экологические условия произрастания.

Уровень дифференциации популяций устанавливали по коэффициенту генетической дистанции Неи (1978). Кластерный анализ данных позволил выделить две основные группы среди анализируемых экотипов, условно подразделяющие ареал на северо-западную и юго-восточную части. Выборки, характеризующие север ареала (У, ТС), объединяются с популяцией, максимально удаленной в западном направлении (Нв). Единым кластером выступают популяции, расположенные на территории Ханты-Мансийского АО (Нб, Стр, ВБ) и Томской области (Б). Оказались близки выборки с северо-запада Иркутской области (Т) и с Байкальского хребта (Сб) - дистанцированные, но расположенные практически на одной широте. Популяция из Южного Прибайкалья (С) кластеризовалась с выборками из Западного Саяна, характеризующими среднюю часть лесного пояса и высокогорную границу древесной растительности (Он3 и ЗСП). Малую степень генетических различий демонстрируют популяции из Западного Саяна, расположенные в верхней (граница леса) (Он1) и нижней частях лесного пояса (А), а также на границе его средней и верхней части (Он2), образуя отдельный кластер.

Результаты многомерного анализа изоферментных данных с помощью метода главных компонент представлены на рисунке 1.

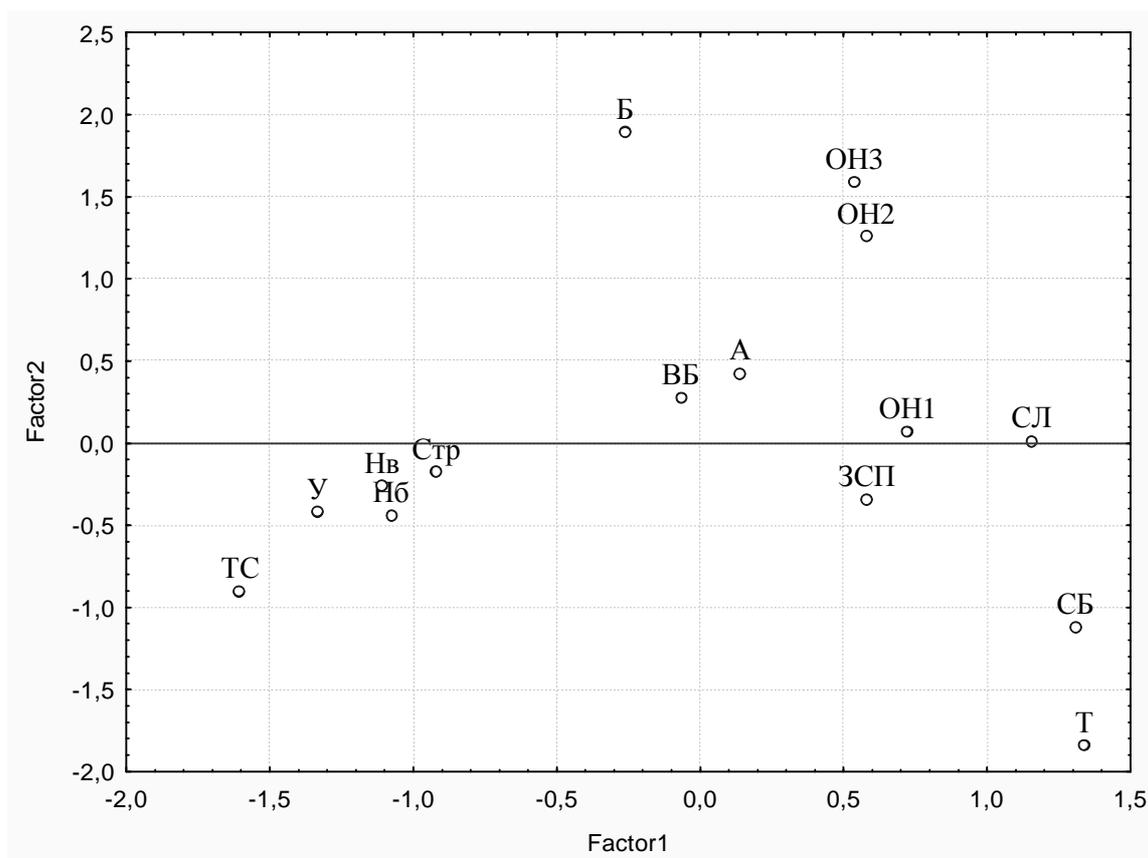


Рисунок 1. Кластеризация выборок сосны кедровой сибирской по изоферментным локусам методом главных компонент.

Полученные в результате статистического анализа первые три главные компоненты объясняют около 56% общей вариации генотипических частот между изучаемыми выборками. При этом в первую компоненту, объясняющую около 28% вариации,

максимальный вклад вносит изменчивость по локусам Pgm-1, Fe-2, Sod-3 и Sod-4. На рисунке видно, что в плоскости первой компоненты явно выделяется группа северных популяций с примыкающей к ней крайней восточной выборкой, примерно в центре располагаются выборки Б и ВБ из средней и южной подзоны тайги, далее достаточно компактно расположены западно-Саянские выборки и выборки из восточной части ареала. В целом, по результатам многомерного анализа изоферментных данных также может быть выделено два основных блока изучаемых популяций, соответствующих северо-западной и юго-восточной частям ареала.

Таким образом, выявленные закономерности в структуре аллельного состава и значительная степень подразделенности экотипов сосны кедровой сибирской свидетельствуют об отзывчивости генетической структуры вида на изменчивость экологических факторов и географическую разобщенность популяций. По данным изоферментного анализа ареал сосны кедровой сибирской подразделяется на северо-западную и юго-восточную части, которые характеризуется различным уровнем генетического разнообразия и специфичным аллельным составом аллозимных локусов. Изоферментные локусы, по которым генетическая подразделенность экотипов выше средней, предположительно имеют селективное значение. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление физиологической специфики белковых продуктов отдельных аллельных вариантов этих генов, их роли в адаптации сосны кедровой сибирской к различным условиям произрастания.

Работы выполнены при частичной поддержке РФФИ, грант № 04-04-49795.

ЛИТЕРАТУРА

- Anatoly I. Iroshnikov, Dmitri V. Politov. Five-Needle Pines in Russia: Introduction and Breeding In: Sniezko, Richard A.; Samman, Safiya; Schlarbaum, Scott E.; Kriebel, Howard B. eds. 2004. Breeding and genetic resources of five-needle pines: growth, adaptability, and pest resistance; 2001 July 23-27; Medford, OR, USA. IUFRO Working Party 2.02.15. Proceedings RMRS-P-32. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. P. 64-72.
- Dmitri V. Politov, Konstantin Krutovsky. Phylogenetics, Genogeography and Hybridization of Five-Needle Pines in Russia and Neighboring Countries. In: Sniezko, Richard A.; Samman, Safiya; Schlarbaum, Scott E.; Kriebel, Howard B. eds. 2004. Breeding and genetic resources of five-needle pines: growth, adaptability, and pest resistance; 2001 July 23-27; Medford, OR, USA. IUFRO Working Party 2.02.15. Proceedings RMRS-P-32. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. P. 85-97.
- H. Mattes. Size of Pine area in relation to seed dispersal/ In: S.C.Wyman, F.-K. Holtmeier, comps. 1994. Proceedings - International workshop on subalpine Stone Pines and their environment: the status of our knowledge; 1992 September 5-11; St. Moritz, Switzerland. Gen. Tech. Rep. INT-GTR-309. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain research station. P.172-178.
- Krutovskii K.V., Politov D.V., Altukhov Yu.P Genetic differentiation and phylogeny of Stone Pine species based on isozyme loci // In: S.C.Wyman, F.-K. Holtmeier, comps. 1994. Proceedings - International workshop on subalpine Stone Pines and their environment: the status of our knowledge; 1992 September 5-11; St. Moritz, Switzerland. Gen. Tech. Rep. INT-GTR-309. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain research station. P.19-30.
- Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, 1994. 574 p.

Peacall, R., Smouse P.E. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. Canberra, Australia, Austr. Nat. Univ., 2001. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>.

Politov D. V., Belokon M. M., Maluchenko O. P., Belokon Y. S., Molozhnikov V. N., Mejnartowicz L. E., Krutovskii K. V. Genetic evidence of natural hybridization between Siberian stone pine, *Pinus sibirica* Du Tour, and dwarf Siberian pine, *P. pumila* (Pall.) Regel // Forest Genetics. 1999. V. 6. № 1. P. 41-48.

Politov, D.V. 1998. Coniferous Forests of Baikal Lake Region: Native Population Genetic Structure and Human Impact. UNESCO Programme on Man and the Biosphere (MAB), MAB Young Scientist Research Award Scheme - Final Scientific Report. <http://www.unesco.org/mab/capacity/mys/97/Politov/Politov.htm>.

Алтухов Ю. П. (под ред.). Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука, 2004. 431 с.

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 2003. с.

Белоконь М. М., Белоконь Ю. С., Политов Д. В., Алтухов Ю. П. Аллозимный полиморфизм европейской кедровой сосны (*Pinus cembra* L.) в горных популяциях Альп и Восточных Карпат // Генетика. 2005. Т. 41. № 11. С. 1538-1551.

Гончаренко Г.Г., Силян А.Е. популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири. - Мн.: Тэналогія, 1997. - 191 с.

Крутовский К. В., Политов Д. В., Алтухов Ю. П. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение I. Механизмы генного контроля изоферментных систем // Генетика. 1987. Т. 23. № 12. С. 2216-2228.

Крутовский К. В., Политов Д. В., Алтухов Ю. П., Милютин Л.И., Кузнецова Г.В., Ирошников А.И., Воробьев В.Н., Воробьева Н.А. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour // Генетика. 1989. Т. 25. № 11. С. 2009-2032.

Огуреева Г.Н. Ботаническая география Алтая. М.: Наука, 1980. 190 с.

Подогас А.В. Генетическая дифференциация рода *Pinus* по аллозимным локусам. Дис. на соиск. уч. ст. кандидата биол. наук, Российская академия наук, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Москва, 1993. 154 с.

Политов Д. В. Аллозимный полиморфизм, генетическая дифференциация и система скрещивания сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Москва, : Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова АН СССР, 1989. 190 с.

Политов Д. В., Крутовский К. В. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение V. Анализ системы скрещивания // Генетика. 1990. Т. 26. № 11. С. 1309-1316.

Семечкин И.В., Поликарпов Н.П., Ирошников А.И. Кедровые леса Сибири. Новосибирск, 1985. 257 с.

Distribution of genetic diversity in Siberian Stone Pine (*Pinus sibirica* Du Tour): isozyme markers data.

Petrova Elena A., Goroshkevich Sergey N., Politov Dmitri V.

Distribution of genetic diversity in Siberian Stone Pine (Pinus sibirica Du Tour) was examined using isozyme markers. 15 ecotypes of Pinus sibirica presenting latitude, longitude and altitude transects of the species range were analysed using starch gel electrophoresis of isozymes from vegetative tissue (buds). The genotypes of 250 clones were determined by 26 loci coding for 16 enzymes. Significant relationship of allele frequency on some isozyme loci and geographic coordinates of the ecotypes was revealed. We conclude that latitude zoning has a great impact on formation of genofund structure of Siberian Stone Pine. Geographic variation of loci showing high F_{ST} presumably has an adaptive value.