На правах рукописи

Капралов Максим Владимирович

Популяционная структура комплекса *Saxifraga cernua* L. – *S. sibirica* L. на Урале и факторы, ее определяющие

03.00.16 - экология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург
2004

Работа выполнена в Институте экологии растений и животных Уральского отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Глотов Николай Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Позолотина Вера Николаевна

кандидат биологических наук
Князев Михаил Сергеевич

Ведущая организация: Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Защита состоится 16 ноября 2004 г. в 16 часов на заседании Диссертационного совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений и животных УрО РАН по адресу: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии растений и животных УрО РАН.

Автореферат разослан «14» октября 2004 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук Нифонтова М.Г.

Актуальность темы. Многие организмы могут производить потомство, генетически идентичное родителю – клоны. Существуют противоречивые предположения относительно структуры популяций, где половой процесс отсутствует или редок: популяции состоят из нескольких локальных генотипов (Williams, 1975; Janzen, 1977); популяции агамных организмов могут быть также полиморфны, как и у организмов с регулярным половым процессом (Maynard Smith, 1971; Price, Waser, 1982; Lynch, 1984). В популяциях клональных животных найден высокий генетический полиморфизм, но они менее изменчивы, чем популяции родственных видов с половым размножением (Parker, 1979). Для клональных растений было показано генотипическое разнообразие, сопоставимое с таковым у видов с облигатным половым размножением (Ellstrand, Roose, 1987; Widen et al., 1994) и, возможно, формируемое спорадическим половым размножением (Eriksson, 1993), соматическими мутациями (Fernando, Cass, 1996), миграцией клонов, гетерогенностью местообитаний (Abrahamson, 1980). Несмотря на многочисленные исследования, вопрос о факторах, поддерживающих генотипическое разнообразие в популяциях клональных растений, остается дискуссионным (Ellstrand, Roose, 1987).

Выбранный нами вид – камнеломка поникающая (*Saxifraga cernua* L.) – клональное аркто-альпийское растение с варьирующим соотношением полового и бесполого размножения (Molau, 1992; Brochmann, Håpnes, 2001). Вид характеризуется контрастным внутрипопуляционным генотипическим разнообразием (Bauert et al., 1998; Gabrielsen, Brochmann, 1998; Kjølner et al., 2004). На Урале существуют относящиеся к циркумполярной арктической части ареала полярноуральские популяции *S. cernua* и периферические популяции Северного, Среднего и Южного Урала. На Южном Урале обитает близкий вид с облигатно семенным воспроизводством – *S. sibirica* L. На Среднем Урале доминируют популяции растений промежуточного облика между *S. cernua* и *S. sibirica* (Капралов, 2003).

Цель работы – исследование популяционной структуры комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* генетическими методами и факторов, предположительно определяющих популяционную структуру (соотношение полового и бесполого воспроизводства, кариологический полиморфизм, история популяций). **Основные задачи**: 1. Выявить меж- и внутрипопуляционную генетическую структуру комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* в уральской части ареала. 2. Проверить гипотезу гибридного происхождения (*S. cernua* x *S. sibirica*) среднеуральских растений с промежуточными значениями морфологических признаков. 3. Изучить репродуктивную биологию растений комплекса в природных условиях и при культивировании в лаборатории. 4. Выявить хромосомный полиморфизм в популяциях. 5. Проанализировать взаимосвязь внутрипопуляционной генетической изменчивости с репродуктивными стратегиями, плоидностью растений, историей популяций.

Научная новизна. Впервые получены сведения о популяционной структуре, репродуктивном и кариологическом полиморфизме комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* с использованием одних и тех же популяций. Выявление генетической изменчивости с помощью анализа ДНК (AFLP) является первым для травянистых растений Урала. Доказано гибридное происхождение ряда среднеуральских популяций. Установлены генетически обусловленные морфологические различия между *S. cernua, S. sibirica* и гибридами. Показано, что половое размножение является ведущим фактором, определяющим генотипическое разнообразие в популяциях комплекса.

Теоретическое и практическое значение. Полученные данные расширяют знания о популяционной структуре клонообразующих растений и адаптивном значении пола. Внесен определенный вклад в решение вопросов формирования аркто-альпийской флоры Урала. Показана эффективность анализа ДНК (AFLP) для выявления структуры популяций полиплоидных организмов. Полученные результаты важны для разработки стратегии охраны реликтовых видов флоры Урала.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Уральские популяции комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* обладают высоким генетическим, морфологическим, кариологическим и репродуктивным полиморфизмом.

2. Среднеуральские популяции растений с промежуточной морфологией возникли вследствие гибридизации *S. cernua* x *S. sibirica*.

3. Для популяций среднеуральских гибридов и *S. sibirica* характерен максимальный уровень генотипического разнообразия, для полярноуральских популяций *S. cernua* – относительно высокий, для периферических популяций *S. cernua* Северного и Среднего Урала – крайняя генетическая обедненность.

4. Ведущая роль в формировании внутрипопуляционного генотипического полиморфизма принадлежит половому размножению, которое является регулярным в популяциях *S. sibirica* и гибридов, спорадическим в популяциях *S. cernua* из центра ареала и не обнаружено в южных периферических популяциях *S. cernua*.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены: 1) **в виде стендовых докладов** на конференции молодых ученых «Проблемы глобальной и региональной экологии» (Екатеринбург, 2003), на II международной конференции «Анатомия и морфология растений» (Санкт-Петербург, 2002); 2) **в виде устных докладов** на конференции молодых ученых «Биота горных территорий: история и современное состояние» (Екатеринбург, 2002), на VI всероссийском популяционном семинаре «Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии» (Нижний Тагил, 2002), на XI международном совещании по филогении растений (Москва, 2003), на международной конференции «VII Clonal Plant Workshop: Reproductive strategies, biotic interactions and metapopulation dynamics» (Куусамо, Финляндия, 2003), на международном конгрессе «IX Congress of European Society for Evolutionary Biology» (Лидс, Великобрита-

ния, 2003), на конференции молодых ученых «Экологические механизмы динамики и устойчивости биоты» (Екатеринбург, 2004), на VIII молодежной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2004), на заседании Норвежского ботанического общества (Осло, Норвегия, 2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объем работы. Работа состоит из введения, шести глав, выводов и приложения. Диссертация изложена на 161 странице, включает 12 таблиц и 14 рисунков. Список литературы содержит 194 источника, в том числе 151 иностранный.

Глава 1. Объект исследования

Проведен обзор литературы, посвященной экологии и эволюции рода *Saxifraga*, морфологическому, кариологическому и репродуктивному полиморфизму, распространению и популяционной структуре *S. cernua* и *S. sibirica*.

Глава 2. Характеристика районов исследования и методика

Приведен литературный обзор природных условий Полярного, Северного, Среднего и Южного Урала и палеоклимата Урала в позднем плейстоцене-голоцене (микулинское межледниковье, валдайская эпоха).

Методика исследования. Нами было исследовано 17 популяций: шесть – *S. cernua* из основной циркумполярной части ареала, четыре – *S. cernua* с южной периферии ареала, четыре – *S. sibirica*, три – предполагаемые гибриды (табл. 1). Выполнены три вида анализа: генетический (полиморфизм ДНК и аллозимов), кариологический и репродуктивной биологии. По возможности все виды анализа проводили с использованием одних и тех же растений. Материал собирали во время полевых маршрутов 2000–2002 гг. Расстояние между собираемыми растениями в популяциях превышало пять метров; площадь, с которой собирали растения в пределах одной популяции, не превышала 0,01 км^2 (кроме популяции №7, где 200 м и 1 км^2, соответственно). В лаборатории растения культивировали в отдельных пла-

стиковых горшках, при температуре 18°–22°С и круглосуточном искусственном освещении. Время культивирования для большинства растений составило около двух лет, в течение которых они неоднократно цвели. Подробное описание использованных в работе методов приведено в соответствующих главах. Для статистической обработки материала использовали пакет STATISTICA 6 (2001), за исключением специально оговоренных случаев. Для сравнения данных, полученных на полевом и лабораторном материале, и сравнения групп популяций использовали непараметрический тест Манна-Уитни; для проверки гипотезы о существовании линейной корреляции использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s).

Таблица 1. Исследованные популяции комплекса S. cernua – S. sibirica

№	Тип	Местонахождение	N	Широта °N	Долгота °E	Высота, м н.у.м.
1	CER	Река Байдарата-Яха	10	68°05′	66°25′	300
2	CER	Река Щучья	5	67°54′	66°38′	280
3	CER	143 км ж/д Обская	10	67°20′	68°24′	50
4	CER	Ручей Сенька-Шор	10	66°55′	65°46′	200
5	CER	Река Собь	7	66°55′	65°44′	200
6	CER	Ручей Орех-Еган	8	66°48′	65°25′	200
7	CER	Денежкин Камень	10	60°26′	59°34′	1350
8	CER	Река Сосьва	3	60°22′	60°08′	150
9	CER	Река Сосьва	10	60°14′	60°23′	160
10	INT	Река Чусовая	15	57°40′	58°53′	300
11	INT	Река Реж	15	57°29′	61°32′	150
12	CER	Река Чусовая	10	57°20′	59°15′	300
13	INT	Река Серга	10	56°30′	59°16′	300
14	SIB	Река Юрюзань	15	54°58′	58°08′	300
15	SIB	Река Минка	6	54°56′	58°59′	300
16	SIB	Река Катав	2	54°39′	58°13′	350
17	SIB	Озеро Банное	3	53°37′	58°35′	600

Примечание. Тип растений: CER – S. cernua; SIB – S. sibirica; INT – растения промежуточной морфологии. N – число растений, взятое для ДНК-анализа. Популяции упорядочены в соответствии с широтой: с севера на юг.

Глава 3. История формирования комплекса *Saxifraga cernua* – *S. sibirica* на Урале

Для выявления структуры комплекса популяций и проверки гипотезы гибридогенного происхождения части среднеуральских популяций мы исследовали полиморфизм ДНК методом AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al., 1995). Анализ был проведен нами в молекулярной лаборатории Университета Осло (Норвегия) в соответствии с протоколом AFLP™ Plant Mapping Kit (Applied Biosystems, AB) с использованием следующих сочетаний праймеров: преселективный 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' и селективный 5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'; преселективный 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3' и селективные 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3', 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3' и 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'. Анализ AFLP-фрагментов проводили с использованием секвенатора ABI 3100 sequencer (AB). Полученные профили были обработаны в программе ABI prism GeneScan 3.7. Для дальнейшего анализа использовали бинарную матрицу присутствующих (1) и отсутствующих (0) фрагментов.

Использованные комбинации праймеров вместе дали 253 полиморфных AFLP-фрагмента, выявивших 98 генет (AFLP-фенотипов) среди взятых в анализ 149 растений (табл. 1). Фиксированных маркеров, специфичных для отдельных популяций или видов, не было обнаружено, популяции различались лишь по частотам AFLP-фрагментов, что подтверждает большую генетическую близость *S. cernua* и *S. sibirica*.

Кластеризация методом объединения соседей (Treecon 1.3b; Van de Peer, De Wachter, 1994) и невзвешенным парно-групповым методом (NTSYS 1.80; Rohlf, 1994) показала четкое структурирование растений по четырем географическим регионам. Исключение составила среднеуральская популяция №12, отнесенная к популяциям с Северного Урала. *Saxifraga cernua*, *S. sibirica* и предполагаемые гибриды кластеризовались отдельно друг от друга, последние помещались между *S. cernua* и *S. sibirica* (рис. 1).

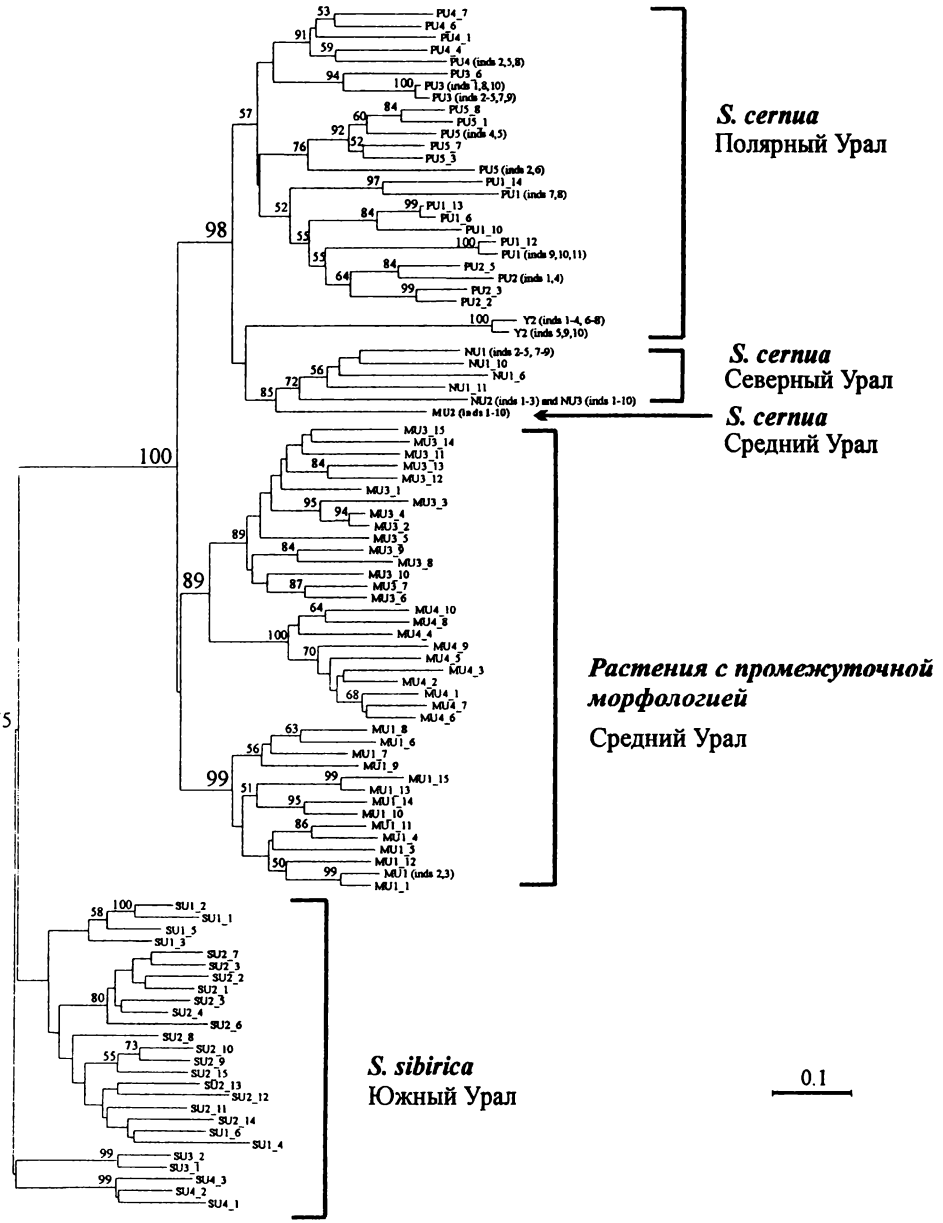

Рис. 1. Кладограмма 98 AFLP-фенотипов, представляющих 17 исследованных популяций. Кластерный анализ выполнен методом объеденения соседей.

Тест на отнесение особей из популяций предполагаемых гибридов к родительским видам или к искусственно созданной популяции гибридов F1 на основании частот AFLP-маркеров (AFLPOP; Duchesne, Bernatchez, 2002) показал высокую вероятность гибридного происхождения трех средне-уральских популяций.

Кластеризация уральских популяций комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* на основе анализа ДНК соответствует группам, выделенным на основании морфологических признаков и географического распространения растений: 1) полярноуральская *S. cernua* из основной части ареала; 2) периферические реликтовые популяции *S. cernua* с Северного и Среднего Урала; 3) *S. sibirica* с Южного Урала; 4) среднеуральские популяции растений с промежуточной морфологией, возникшие вследствие гибридизации *S. cernua* x *S. sibirica*.

Нами предложена гипотеза формирования современной структуры комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* на Урале. *Saxifraga sibirica* не распространена в Арктике, следовательно, наиболее вероятна ее миграция на Южный Урал непосредственно из центрально-азиатского участка ареала, скорее всего, с Алтая через Казахский мелкосопочник и продвижение на север вдоль Уральского хребта. *Saxifraga cernua* повсеместно распространена на Полярном Урале, южнее вид представлен популяциями горных тундр и скальных обнажений речных долин, причем число популяций *S. cernua* резко снижается по мере продвижения на юг. Весьма вероятно, что во время оледенений, будучи характерным компонентом перигляциальной тундры, *S. cernua*, подобно многим аркто-альпийским видам, расселилась из Арктики на юг до Южного Урала (Горчаковский, 1969). Свидетельством встречи двух близких видов на Среднем Урале служат гибридные популяции, распространенные здесь шире, чем оба родительских вида. По-видимому, следует говорить об интрогрессивной гибридизации *S. cernua* x *S. sibirica* и обособлении гибридных популяций от родительских видов.

Глава 4. Репродуктивная биология растений уральских популяций комплекса *Saxifraga cernua – S. sibirica*

Оценку полового и бесполого размножения проводили, подсчитывая количество цветков и вегетативных пропагул (ВП) на генеративный побег. Среднее число цветков в популяционных выборках варьировало от 0 до 10 (табл. 2) и возрастало в ряду *S. cernua* → гибриды → *S. sibirica* (проанализировали 370 растений из 12 популяций в природе и 107 растений из 15 популяций в лаборатории). Среднее число ВП в популяционных выборках варьировало от 0 до 219 (табл. 2) и уменьшалось в ряду *S. cernua* → гибриды → *S. sibirica* (проанализировали 160 растений из 11 популяций в природе и 107 растений из 15 популяций в лаборатории). В большинстве случаев статистически значимых различий в количестве цветков и ВП на генеративных побегах, при сравнении образцов, собранных в природе и выращенных в условиях лаборатории, обнаружено не было (исключения см. табл. 2). Полярноуральские растения и *S. cernua* из периферических популяций значимо не различались между собой по числу цветков и ВП, но отличались от среднеуральских гибридов и *S. sibirica*, а гибриды и *S. sibirica* – друг от друга. Числа цветков и ВП являются ключевыми морфологическими признаками для разделения *S. cernua*, *S. sibirica* и гибридов. Сохранение различий при совместном выращивании растений из различных популяций в лаборатории и отсутствие различий между природными и лабораторными выборками свидетельствуют о значительной генетической детерминированности соотношения структур полового и бесполого размножения.

Мужскую фертильность выявляли окрашиванием пыльцы ацетокармином (45 растений из 5 популяций в природе и 84 растения из 14 популяций в лаборатории; табл. 2). Фертильность пыльцы возрастает в ряду *S. cernua* из периферических популяций → *S. cernua* из полярноуральских популяций → гибриды и *S. sibirica*. При сравнении лабораторных данных

полярноуральские и периферические растения *S. cernua* значимо различались между собой (P<0,001) и отличались от гибридов и *S. sibirica* (P<0,001); последние не отличались друг от друга.

Ни одна из четырех выделенных нами групп популяций значимо не отличалась от других по числу семяпочек на цветок (исследовали 25 растений из трех популяций в поле и 74 растения из 10 популяций в лаборатории; табл. 2). Развитие семяпочек было проверено в 35 цветках с отсутствием нормального развития рыльцевой поверхности (растения из периферических популяций *S. cernua* №№ 7, 9, 12) и у 22 контрольных растений с нормальным развитием (популяции №№ 5, 11, 14). У растений из периферических популяций 16 % цветков характеризовались фертильными семяпочками и 84 % – стерильными. В контрольных популяциях все цветки имели фертильные семяпочки.

Выявленная нами полная или частичная мужская и женская стерильность растений уральских периферических популяций *S. cernua* сходна с данными для периферических популяций в других районах: Колорадо (Wehrmeister, Bonde, 1977), Шотландия (Godfree, 1979), Хонсю (Funamoto, Nakamura, 1996). В отличие от растений периферических популяций, полярноуральские растения *S. cernua* способны к спорадическому семенному воспроизводству, хотя чаще размножаются вегетативно. Это подтверждается относительно высокой фертильностью пыльцы, образованием жизнеспособных семян при искусственном опылении и находками растений с вызревшими семенами в природе. Способность к образованию семян показана для растений *S. cernua* на Кольском полуострове (Скиткина, 1975), Аляске (Wehrmeister, Bonde, 1977), Шпицбергене (Brochmann, Hapnes, 2001) и в Скандинавии (Molau, 1992). По-видимому, относительно высокая фертильность растений из арктических популяций *S. cernua* и стерильность растений периферических популяций является общим правилом.

Высокая фертильность *S. sibirica* была ожидаемой для вида с облигатно семенным размножением. Менее ожидаемой была высокая фертильность гибридов, в популяциях которых мы наблюдали обильное образование семян с высокой всхожестью. Среднеуральские гибриды *S. cernua* x *S. sibirica* подтверждают, что межвидовая гибридизация является распространенным явлением в роде *Saxifraga* (Webb, Gornall, 1989).

Глава 5. Полиплоидные ряды в комплексе *Saxifraga cernua – S. sibirica* на Урале

Хромосомные числа были подсчитаны с использованием световой микроскопии при увеличении x1000 для 20 растений из 7 популяций. В качестве материала использовали корешки прорастающих вегетативных пропагул или семян. После обработки 0,1% раствором колхицина и гидролиза препараты окрашивали реактивом Фельгена. Выявлены три хромосомных числа: 2n=16 (*S. sibirica*); 2n=24 (гибриды и *S. cernua*); 2n=c.36 (*S. cernua*). Проточная цитометрия была использована для определения плоидности 116 растений из 17 популяций. В анализе использовали суспензию клеток из свежесорванных молодых листьев и цитометр PAS II (Partec GmbH), латук (*Lactuca sativa* L.) как внутренний стандарт и флуоресцентный краситель DAPI. Использование растений с ранее определенными хромосомными числами позволило интерпретировать относительное содержание ДНК в клетке как уровень плоидности. Выявлены 4 группы, отличающиеся по содержанию ДНК ($P<0,001$): 2n=16, 24, c.36 и c.48 или уровни плоидности 2x, 4x, 6x и 8x, соответственно. Все исследованные растения *S. sibirica* имели 2n=16; все гибриды – 2n=24; растения трех периферических популяций *S. cernua* (№№8, 9, 12) – 2n=c.36; в популяции №7 были растения трех уровней плоидности: 2n=24, c.36 и c.48; полярноуральские растения *S. cernua* имели 2n=24 (популяции №№2, 4, 6) и 2n=c.48 (№3), в популяциях №1 и 5 содержались растения с 2n=24 и c.48 (табл. 2). По-видимому, большая часть растений комплекса характеризуется полными

наборами хромосом, но анеуплоиды присутствуют в популяциях *S. cernua*, о чем свидетельствуют стерильные растения с промежуточным количеством ДНК. Наши данные делают Урал наряду с Берингией и Скандинавией одним из центров известного хромосомного разнообразия *S. cernua*.

Таблица 2. Показатели кариологического и репродуктивного полиморфизма в исследованных популяциях

	2n		Относительное кол-во ДНК				Количество цветков			
№	N		N	Ср.	СО	xx	N	Ср.		СО
1 ЛАБ			3	0,50	0,006	~ 8x	6	0,2		0,41
1 ЛАБ			4	0,34	0,030	~ 4x				
2 ЛАБ			3	0,31	0,012	~ 4x	4	0,8		0,96
3 П							50	0,7		0,47
3 ЛАБ			10	0,52	0,005	~ 8x	10	0,7		0,48
4 П							50	0,6	*	0,49
4 ЛАБ			10	0,35	0,008	~ 4x	10	1,0	*	0,00
5 П							50	1,4		1,13
5 ЛАБ			1	0,50		~ 8x	6	0,8		0,41
5 ЛАБ	3	24	4	0,35	0,006	~ 4x				
6 П			8	0,35	0,008	~ 4x	50	0,5		0,58
7 П							10	0,3	**	0,48
7 ЛАБ			1	0,50		~ 8x	10	1,0	**	0,00
7 ЛАБ	3	c.36	4	0,42	0,010	~ 6x				
7 ЛАБ			2	0,37	0,000	~ 4x				
8 ЛАБ	1	c.36	3	0,40	0,000	~ 6x	3	0,0		0,00
9 П							10	0,8		0,42
9 ЛАБ			9	0,42	0,003	~ 6x	10	1,2		0,42
10 П							25	3,4		1,75
10 ЛАБ			10	0,35	0,008	~ 4x	9	2,3		2,18
11 П							35	3,1		2,12
11 ЛАБ	4	24	10	0,35	0,007	~ 4x	8	2,6		2,26
12 ЛАБ			8	0,44	0,004	~ 6x	10	0,2		0,42
13 П							50	4,9	**	2,11
13 ЛАБ	4	24	10	0,35	0,007	~ 4x	10	2,8	**	1,87
14 П							25	5,0		1,54
14 ЛАБ			10	0,18	0,003	~ 2x				
15 П							10	5,0	*	2,14
15 ЛАБ			2	0,18	0,000	~ 2x	6	8,0	*	2,83
16 ЛАБ	2	16	1	0,18		~ 2x	2	10,1		1,41
17 П							5	4,4		1,5
17 ЛАБ	3	16	3	0,18	0,000	~ 2x	3	8,7		3,50

*Примечание. № - номер популяции в соответствии с нумерацией популяций в таблице 1; П – природный материал; ЛАБ – лабораторный материал; 2n – число хромосом; xx – предполагаемый уровень плоидности; N – количество растений в выборке; Ср. – среднее; СО – стандартное отклонение. Показаны значимые различия природных и лабораторных выборок из одной популяции: * P<0,05, ** P<0,01.*

Таблица 2 (продолжение)

	Количество вегетативных пропагул			Количество семяпочек			Фертильность пыльцы, %		
№	N	Ср.	СО	N	Ср.	СО	N	Ср.	СО
1 ЛАБ	6	219	109,5	4	117	32,7	4	73	7,0
2 ЛАБ	4	107	55,0	3	227	142,5	2	83	11,3
3 П	10	102	26,0	10	153	56,3			
3 ЛАБ	10	91	21,8				3	63	7,0
4 П	10	165	58,3						
4 ЛАБ	10	140	65,1	10	200	44,1	9	77	7,0
5 П	10	112	45,3	9	223	98,8	10	91	8,0
5 ЛАБ	6	124	103,6				5	79	22,2
6 П	10	129	49,4						
7 П	10	79 *	68,2						
7 ЛАБ	10	139 *	44,9	6	162	57,8	6	37	23,2
8 ЛАБ	3	88	23,7						
9 ЛАБ	10	74	41,5	10	177	73,0	10	44	11,8
10 П	25	49	24,0	6	176	64,3	10	99 *	1,2
10 ЛАБ	9	59	33,8	8	190	112,4	8	89 *	5,1
11 П	35	51	32,0						
11 ЛАБ	8	54	21,4	7	184	81,3	7	95	5,3
12 ЛАБ	10	112	37,3				2	42	10,6
13 П	10	19 *	10,4				10	94	5,1
13 ЛАБ	10	38 *	35,7	10	207	60,7	10	90	5,5
14 П	25	0	0,0						
14 ЛАБ				10	222	103,1	10	94	3,1
15 П	10	0	0,0				10	97 **	0,9
15 ЛАБ	6	0	0,0	6	256	55,6	6	86 **	15,5
16 ЛАБ	2	0	0,0				2	98	0,7
17 П	5	0	0,0				5	91	4,6
17 ЛАБ	3	0	0,0						

Наличие в популяциях *S. cernua* растений с различной плоидностью вместе с высокой структурированностью популяций, показанной в главе 3, позволяет предположить непрерывное образование полиплоидов и анеуплоидов в популяциях вида. Это хорошо согласуется с концепцией постоянного и независимого возникновения полиплоидов, утверждающей, что полиплоидизация в популяциях многих кариологически полиморфных видов – регулярное и часто повторяющееся событие (Soltis, Soltis, 1993). Характерные для гибридов и *S. sibirica* эуплоидные наборы хромосом могут быть как причиной, так и следствием ведущей роли полового размножения.

Значимые отрицательные корреляции содержания ДНК с признаками семенного размножения (количество цветков r_s= -0,42; P<0,001; фертильность пыльцы r_s= -0,60; P<0,001) и положительные – с количеством вегетативных пропагул (r_s=0,33; P<0,001) и географической широтой (r_s=0,55; P<0,05), отрицательные корреляции с широтой количества цветков (r_s= -0,75; P<0,001) и фертильности пыльцы (r_s= -0,55; P<0,05) и положительная – количества ВП (r_s=0,84; P<0,001) наблюдались при совместном анализе всех популяций (все корреляции приведены для лабораторных данных), что согласуется с феноменом увеличения роли бесполого размножения с увеличением плоидности и широты (Bierzychudek, 1985). При анализе *S. cernua* наблюдалась только значимая отрицательная корреляция содержания ДНК с фертильностью пыльцы (r_s= -0,56; P<0,001). Здесь мы наблюдаем более сложную картину, чем просто увеличение плоидности и роли бесполого размножения с увеличением широты, как интегрального показателя климата. На проявляющийся при анализе всех популяций комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* тренд увеличения плоидности и роли бесполого размножения с возрастанием широты накладывается, идущий в популяциях *S. cernua* в противоположном направлении, тренд увеличения плоидности и роли бесполого размножения по направлению к южной периферии ареала вида.

Глава 6. Клональная структура и генетическое разнообразие в уральских популяциях комплекса *Saxifraga cernua* – *S. sibirica*

Клональное разнообразие оценивали с помощью аллозимного анализа (120 растений из 8 популяций) и бинарной матрицы AFLP-фрагментов (139 растений из 16 популяций, популяция №7 была исключена). Для аллозимного анализа использовали 12 выборок по 10 растений из 8 популяций: пять полярноуральских, две периферических и пять выборок из популяций гибридов (табл. 3). Электрофорез белков проводили в ПААГ по протоколу (Семериков, Беляев, 1995). Выявлено 10 полиморфных систем: ADH (К.Ф.1.1.1.1), SkDH (К.Ф.1.1.1.25), IDH (К.Ф.1.1.1.42), 6-PGD (К.Ф.1.1.1.43),

G6PD (К.Ф.1.1.1.49), FDH (К.Ф.1.2.1.2), GOT (К.Ф.2.6.1.1), EST (К.Ф.3.1.1.1), PGI (К.Ф.5.3.1.9), PGM (К.Ф.5.4.2.2). Из-за полиплоидии интерпретация в терминах «локус – аллель» была невозможна. Для выявления отдельных клонов использовали сходство или различия аллозимных спектров. Для оценки клонального разнообразия использовали индекс Симпсона ($D = 1 - \{[\sum n_i(n_i - 1)]/[N(N - 1)]\}$, где n_i – число растений с AFLP- или аллозимным фенотипом i, а N – число всех анализируемых растений). Внутрипопуляционное разнообразие генет вычисляли на основе частот AFLP-фрагментов с использованием: 1) процента полиморфных фрагментов; 2) индекса Шеннона ($H = - \Sigma p_i log_2 p_i$, где p_i – частота AFLP-фрагмента в популяции; Lewontin, 1972); 3) индекса внутрипопуляционного полиморфизма φ ($\varphi = 1 - 2n_{xy}/(n_x + n_y)$, где n_x и n_y – числа фрагментов в генетах x и y, а n_{xy} – число общих фрагментов для x и y), усредненного с использованием всех комбинаций пар генет внутри популяции.

Сравнение результатов AFLP и аллозимного анализа показывает большую точность первого, хотя в целом результаты сходны (табл. 3). По данным AFLP, индекс Симпсона (D) исследованных популяций варьировал от 0 (периферические популяции *S. cernua*) через D=0,47-0,93 (полярноуральские популяции) до 1 (популяции гибридов и *S. sibirica*). D периферических популяций *S. cernua* был значимо ниже D остальных групп ($P<0,05$), в то время как D полярноуральских популяций *S. cernua* был значимо ниже, чем D в популяциях *S. sibirica* и гибридов ($P<0,05$). Среднее генотипическое разнообразие *S. cernua* с Полярного Урала (D=0,78) сходно с таковым популяций *S. cernua* из Гренландии (D=0,86; Gabrielson, Brochmann, 1998) и Шпицбергена (D=0,52; Kjølner et al., 2004), а среднее для этих трех регионов (D=0,72) выше или примерно равно среднему генотипическому разнообразию в популяциях клональных растений (D=0,62; Ellstrand, Roose, 1987; D=0,75; Widen et al., 1994). Обнаруженный полиморфизм не подтверждает гипотезу D.Webb и R.Gornall (1989) о доминировании в Арктике больших

моноклональных популяций *S. cernua*. Имитационное моделирование показало, что даже редкие события полового размножения достаточны для поддержания высокого уровня генетического разнообразия в популяциях растений (Watkinson, Powell, 1993). Спорадическое семенное воспроизводство во время вегетационных сезонов с благоприятными условиями – наиболее вероятное объяснение высокого генотипического разнообразия циркумполярных популяций *S. cernua*.

Таблица 3. Внутрипопуляционное генотипическое и генетическое разнообразие уральских популяций комплекса S. cernua – S. sibirica

№ популяции	Тип популяции	$D_{аллозимы}$	D_{AFLP}	% PF	H	φ
1, выборка №1	*S. cernua*	–	0,91	84,6	0,35	0,34
2, выборка №1	*S. cernua*	–	0,90	57,1	0,25	0,23
3, выборка №1	*S. cernua*	–	0,47	9,6	0,05	0,05
4, выборка №1	*S. cernua*	0,60	0,60	36,3	0,17	0,15
5, выборка №1	*S. cernua*	0,82	0,86	65,0	0,30	0,25
5, выборка №2	*S. cernua*	0,73	–	–	–	–
5, выборка №3	*S. cernua*	0,82	–	–	–	–
6, выборка №1	*S. cernua*	0,84	0,93	67,9	0,27	0,23
8, выборка №1	*S. cernua*	–	0,00	0,00	0,00	0,00
9, выборка №1	*S. cernua*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10, выборка №1	гибриды	0,93	0,99	82,4	0,31	0,27
10, выборка №2	гибриды	0,96	–	–	–	–
11, выборка №1	гибриды	0,98	1,00	82,1	0,32	0,27
12, выборка №1	*S. cernua*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13, выборка №1	гибриды	0,96	1,00	77,1	0,29	0,24
13, выборка №2	гибриды	0,98	–	–	–	–
14, выборка №1	*S. sibirica*	–	1,00	78,4	0,31	0,26
15, выборка №1	*S. sibirica*	–	1,00	58,8	0,24	0,19
16, выборка №1	*S. sibirica*	–	1,00	20,8	0,10	0,12
17, выборка №1	*S. sibirica*	–	1,00	40,4	0,18	0,17

Примечание. $D_{аллозимы}$ и D_{AFLP} – индекс Симпсона выявленный с помощью аллозимов и AFLP; % PF – процент полиморфных AFLP-фрагментов; H – индекс Шеннона; φ – индекс фенотипической гетерогенности.

Отсутствие генотипического разнообразия, выявленное в трех периферических популяциях *S. cernua* с Северного и Среднего Урала, сходно с моноклональностью популяций *S. cernua* из швейцарских Альп (Bauert et al., 1998). Крайняя генетическая обедненность уральских периферических популяций сопровождается частичной или полной мужской и женской стерильностью растений. Наша работа – единственная, где одновременно рассматриваются генотипическое разнообразие и репродуктивная биология с использованием одних и тех же популяций *S. cernua*. Тем не менее, можно предположить, что для расположенных на южном краю ареала популяций *S. cernua* заметная генетическая обедненность, вызванная полной или частичной стерильностью растений, является общим правилом.

Генотипическое разнообразие в популяциях гибридов и *S. sibirica* максимально высокое, что неудивительно для характеризующейся облигатным семенным размножением *S. sibirica*, но менее ожидаемо для гибридов. Анализ ДНК показывает ведущую роль семенного размножения при формировании генетической структуры гибридных популяций.

Три использованные меры генетического разнообразия дали сходные результаты (табл. 3), ниже описан лишь φ. В периферических популяциях *S. cernua* φ=0; в полярноуральских – φ=0,05-0,34; у гибридов φ=0,24-0,27; у *S. sibirica* φ=0,12-0,26. Генетическое разнообразие периферических популяций *S. cernua* было статистически значимо ниже такового в остальных группах ($P<0,05$), в то время как остальные группы значимо между собой не различались. При сравнении усредненных значений для групп популяций видно, что наибольшее среднее φ получено для популяций гибридов (φ=0,26), а наименьшее – для популяций *S. sibirica* (φ=0,19); среднее по полярноуральским популяциям *S. cernua* (φ=0,21) занимает промежуточное значение. Наименьшие отличия между генетами свойственны популяциям диплоида *S. sibirica*, содержащего меньше ДНК, чем полиплоид *S. cernua*. Второй причиной этого, возможно, является реликтовый характер уральского ареа-

ла *S. sibirica*. Напротив, *S. cernua* – полиплоид, распространенный в открытых пространствах тундр с лучшими условия для межпопуляционной миграции. Оба эти фактора способствуют большему среднему генетическому полиморфизму, чем у *S. sibirica*, но спорадичность полового размножения и нестабильный характер местообитаний способствуют значительной изменчивости величины φ. Гибриды характеризуются семенным размножением и полиплоидией, наконец, значительную роль для увеличения внутрипопуляционного генетического разнообразия сыграл и сам факт гибридизации.

Таблица 4. Корреляции между показателями внутрипопуляционного разнообразия, содержанием ДНК и репродуктивными показателями

Показатели (см. примечание)	Внутрипопуляционное генотипическое разнообразие, D				Внутрипопуляционное разнообразие генет, φ			
	Все популяции		*S. cernua*		Все популяции		*S. cernua*	
	N	r_s	N	r_s	N	r_s	N	r_s
ДНК	16	-0,82***	9	-0,65	16	-0,31	9	-0,52
N цв., П	11	0,79***	5	-0,40	11	0,40	5	0,00
N цв., ЛАБ	14	0,81***	8	0,07	14	0,20	8	0,10
N вп, П	10	-0,82***	4	0,40	10	-0,19	4	0,20
N вп, ЛАБ	14	-0,66**	8	0,71**	14	0,06	8	0,76**
N сп., ЛАБ	9	0,39	4	-0,20	9	-0,35	4	-0,20
ФП, П	5	0,06			5	0,46		
ФП, ЛАБ	13	0,92***	7	0,77**	13	0,49	7	0,74*

*Примечание. ДНК – относительное содержание ДНК в клетке; N цв. – количество цветков; N вп – количество вегетативных пропагул; N сп. – количество семяпочек; ФП – фертильность пыльцы, %; П – генеративные побеги собранные в природе; ЛАБ – генеративные побеги выращенные в лаборатории; N – число популяций в анализе; r_s – коэффициент корреляции Спирмена. * $P<0,1$; ** $P<0,05$; *** $P<0,001$.*

При совместном анализе всех популяций количество цветков и фертильность пыльцы значимо положительно коррелировали с клональным разнообразием, а количество вегетативных пропагул и уровень плоидности – отрицательно (табл. 4). Корреляции демонстрируют ведущую роль семенного размножения для поддержания внутрипопуляционного генотипическо-

го разнообразия. Ни один исследованный признак значимо не коррелировал с разнообразием генет в популяциях (φ), когда все популяции анализировались вместе и только фертильность пыльцы положительно коррелировала с φ, когда анализировались популяции *S. cernua* (r_s=0,74; P<0,06; табл. 4), что показывает возрастающую роль других факторов для формирования внутрипопуляционного полиморфизма генет.

Межпопуляционное генетическое разнообразие. Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA, Excoffier et al, 1992) был выполнен в программе ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al., 2000). Периферические популяции *S. cernua*, состоящие из одного клона, были исключены из анализа. AMOVA, проведенный на раметах, демонстрировал завышенную долю межпопуляционной изменчивости по сравнению с анализом на генетах из-за псевдорепликации (63 % и 55 %, соответственно). Заметно увеличение доли внутрипопуляционной изменчивости в ряду *S. cernua* → гибриды → *S. sibirica* (табл. 5), что подтверждает наибольшее распространение полового размножения в популяциях *S. sibirica*, а бесполого – в популяциях *S. cernua*.

Таблица 5. Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA)

Группы	Доля генетического разнообразия	Раметы		Генеты	
		с.с.	%	с.с.	%
(a) три группы	между группами	2	26,6	2	29,4
(1-6), (10-11, 13), (14-17)	между популяциями	10	38,9	10	29,3
	внутри популяций	103	34,5	79	41,3
(b) *S. cernua*, Полярный Урал	между популяциями	5	65,5	5	45,2
(1-6)	внутри популяций	44	34,5	21	54,8
(c) гибриды, Средний Урал	между популяциями	2	41,0	2	40,6
(10, 11, 13)	внутри популяций	37	59,0	36	59,4
(d) *S. sibirica*, Южный Урал	между популяциями	3	36,2	3	36,2
(14-17)	внутри популяций	22	63,8	22	63,8

Примечание. (a) Группировка популяций в три группы: полярноуральская S. cernua, гибриды. S. sibirica. Сокращения: с.с. – число степеней свободы; % – процент генетического разнообразия. Номера популяций даны в скобках. P<0,001 во всех случаях.

ВЫВОДЫ

1. Среди изученных 17 популяций комплекса *S. cernua* – *S. sibirica* на основании генетического анализа выделены четыре группы: 1) *S. cernua* с Полярного Урала, представляющая часть основного циркумполярного ареала вида; 2) периферические реликтовые популяции *S. cernua* с Северного и Среднего Урала; 3) *S. sibirica* с Южного Урала; 4) среднеуральские популяции растений с промежуточной морфологией, возникшие вследствие интрогрессивной гибридизации *S. cernua* x *S. sibirica*.

2. Независимо от географического происхождения, *S. cernua*, *S. sibirica* и гибриды различаются по числу цветков и вегетативных пропагул на генеративном побеге как в природе, так и при культивировании в лаборатории, что свидетельствует о преимущественно генетическом контроле соотношения полового и бесполого размножения.

3. В ряду *S. sibirica* и гибриды → *S. cernua* с Полярного Урала → *S. cernua* из периферических популяций уменьшается мужская и женская фертильность. Основным типом воспроизводства для *S. sibirica* и гибридов является половое размножение, для *S. cernua* – бесполое; половое воспроизводство не обнаружено в периферических популяциях *S. cernua* и спорадически встречается в арктических популяциях вида.

4. Выявлены растения четырех уровней плоидности: диплоидные *S. sibirica* (2n=16), тетраплоидные гибриды и *S. cernua* (2n=24), гексаплоидные и октоплоидные *S. cernua* (2n=c.36 и c.48). Большинство популяций состоит из растений с одинаковой плоидностью, но в трех популяциях *S. cernua* были обнаружены растения с различными хромосомными числами.

5. В полярноуральских популяциях *S. cernua* выявлено относительно высокое клональное разнообразие (D=0,47-0,93), сходное с таковым популяций Гренландии и Шпицбергена. Напротив, для популяций *S. cernua* с Северного и Среднего Урала показана крайняя генетическая обедненность (D=0), сходная с мономорфностью популяций из швейцарских Альп. Ос-

новным механизмом поддержания относительно высокого разнообразия в арктических популяциях *S. cernua* является спорадическое семенное воспроизводство во время вегетационных сезонов с благоприятными условиями. В периферических популяциях половой процесс невозможен из-за стерильности растений. В популяциях гибридов и *S. sibirica* выявлен максимальный уровень генотипического разнообразия (D=1), который поддерживается регулярным семенным воспроизводством. Половое размножение играет ведущую роль в формировании внутрипопуляционного генотипического разнообразия в комплексе *S. cernua* – *S. sibirica*.

СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Капралов М.В., Сарапульцев И.Е., Бетехтина А.А. Полиплоидные ряды вивипарной камнеломки *Saxifraga cernua* L. (Saxifragaceae) на Урале // Биота горных территорий: История и современное состояние: Сб. тр. конф. молодых ученых. Екатеринбург, 2002. С. 79-82.

2. Сарапульцев И.Е., Капралов М.В., Сушенцов О.Е. Онтогенез камнеломки поникающей (*Saxifraga cernua* L.) // Онтогенетический атлас лекарственных растений. Учебное пособие. Йошкар-Ола, 2002. Т. III. С. 185-189.

3. Капралов М.В. Три группы популяций камнеломки *Saxifraga cernua* (Saxifragaceae) на Урале: репродуктивные стратегии и генетическое разнообразие // Природные и городские экосистемы: проблемы изучения разнообразия: Сб. ст. молодеж. науч. семинара. Екатеринбург, 2003. С. 71-75.

4. Капралов М.В. *Saxifraga cernua* L. (Saxifragaceae) на Урале: стратегии размножения, генетическое разнообразие и происхождение // Сб. тезисов XI междунар. совещания по филогении растений. Москва, 2003. С. 48-49.

5. Капралов М.В. Аллозимный полиморфизм и репродуктивная биология плейстоценового реликта *Saxifraga cernua* (Saxifragaceae) на Урале // Уч. зап. НТГСПА. Н. Тагил, 2004. С. 152-154.

6. Капралов М.В. История формирования аркто-альпийского комплекса *Saxifraga cernua – S. sibirica* в Уральских горах // Сб. материалов VIII молодеж. конф. ботаников. СПб., 2004. С. 244.

7. Капралов М.В. Генотипическая изменчивость в популяциях клонообразующего растения *Saxifraga cernua* в центре и на периферии ареала // Экология. 2004. № 6. С. 460-463.

8. Kapralov M.V. Different ratio between sexual and vegetative reproduction in *Saxifraga cernua* L. at southern and northern parts of area // Plant under environmental stress: Proc. Int. Symposium. Moscow, 2001. P.114.

9. Kapralov M.V. Different combinations of sexual and asexual reproduction create contrasting patterns of clonal diversity in bottle-necked populatios: insights from Ural populations of *Saxifraga cernua* // Reproductive strategies, biotic interactions and metapopulation dynamics: Proc. VII Clonal Plant Workshop. Kuusamo (Finland), 2003. P. 36.

10. Kapralov M.V., Gabrielsen T.M., Sarapultzev I.E., Kutlunina N.A., Dymshakova O.S., Brochmann C. The Ural Mountains as a model system for studying South-North differentiation in sexuality and polyploidy, exemplified the nodding saxifrage (*Saxifraga cernua*) // Proc. IX Congr. Europ. Soc. Evolutionary Biology. Leeds (UK), 2003. Abstr. 13.6. P.237.

Подписано в пе

Отпе

г. Екатеринбург,