



© Э.А. Снегин, Е.А. Снегина,
Т.А. Новомлинская

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет, Белгород

На основе ДНК-маркеров (ISSR) изучено состояние генофондов десяти популяций (438 особей) особоохраняемого реликтового вида растений проломника козо-полянского (*Androsace kozo-poljanskii Ovcz. seu Androsace villosa subsp. kozo-poljanskii Fed.*) в условиях юга Среднерусской возвышенности. Полученные данные демонстрируют низкий уровень генетической гетерогенности популяций ($I_{sh} = 0,217 \pm 0,011$; $He = 0,131 \pm 0,007$), а также, несмотря на географическую изоляцию, слабую степень их генетической разобшенности ($\Phi_{st} = 0,136$, $G_{st} = 0,091$).

Анализ мультилокусных генотипов (методами Chao1-bc и 1st order jackknife) позволил выявить группы с потенциально большим и низким количеством генетических комбинаций. Отмечена низкая корреляция между логарифмами уровня потока генов и географических дистанций между популяциями ($r = -0,276 \pm 0,141$), что свидетельствует о нарушении модели изоляции расстоянием и усилении роли стабилизирующего отбора. Выдвигается гипотеза о преимущественном расселении изучаемого вида в прошлом по речным долинам. Значения эффективной численности (N_e), вычисленные на основе индексов подразделенности и уравнения регрессии, находились в диапазоне 4,9–20,4 особи.

✿ **Ключевые слова:** травянистое растение; реликтовый вид; популяционный генофонд; антропогенно-измененный ландшафт.

Поступила в редакцию 27.10.2015
Принята к публикации 19.03.2016

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ОСОБО-ОХРАНЯЕМОГО ВИДА ПРОЛОМНИКА КОЗО-ПОЛЯНСКОГО (*ANDROSACE KOZO-POLJANSKII OVCZ.*) В УСЛОВИЯХ ЮГА СРЕДНЕРУССКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ НА ОСНОВЕ ДНК-МАРКЕРОВ

Оценка состояния популяций уязвимых видов в настоящее время включает комплекс исследований различных сторон их биологии. Одним из важных аспектов такого подхода является изучение популяционных генофондов этих видов, позволяющих с той или иной долей вероятности спрогнозировать дальнейший ход генетических флуктуаций и оценить шансы на выживание этих видов в биосфере.

Целью настоящей работы является анализ состояния генофондов популяции особоохраняемого травянистого растения проломника козо-полянского (*Androsace kozo-poljanskii Ovcz.*¹), обитающего в условиях юга Среднерусской возвышенности.

Проломник козо-полянского является эндемичным видом для Среднерусской возвышенности. Относится к так называемой горно-альпийской флоре, сформировавшейся на территории Среднерусской возвышенности в ледниковую эпоху. Этот вид растет на вершинах и склонах меловых холмов, обычно на открытых или полузатененных участках, предпочитает разреженный травянистый покров. На территории района исследования вид представлен локальными популяциями, четко отграниченными друг от друга значительными по протяженности территориями. *A. kozo-poljanskii* внесен в Красную книгу России и Белгородской области (ограничивающими факторами являются интенсивный выпас скота и разработка меловых карьеров). Встречается в Воронежской, Курской и Белгородской областях в бассейне правых притоков Среднего Дона, в верховьях Оскола и Северского Донца (Виноградов, Голицин, 1954; Голицын, 1956).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве материалов для исследований были использованы листья растений, собранные в десяти пунктах Белгородской области (рис. 1, табл. 1). Сбор растений производился в мае 2013 года. Все собранные образцы хранятся в криобанке лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии НИУ БелГУ. Всего по ДНК-локусам было исследовано 438 особей² *A. kozo-poljanskii* из десяти популяций (см. рис. 1, табл. 1).

Анализ изменчивости проводили с использованием полимеразной цепной реакции — метод ISSR (*Inter simple sequence repeats*) (Zietkiewicz et al., 1994). Для анализа использовали два праймера: *IT1* (5'-(CA)₈GT-3') и *UBC820* (5'-(GA)₈C-3'). Амплификацию осуществляли в термоциклерах MJ Mini и MyCycler (Bio-Rad, США). Реакцию проводили в 25 мкл

¹ В ряде источников этот вид рассматривают как подвид проломника мохнатого *Androsace villosa subsp. kozo-poljanskii Fed.*

² Ввиду того что *A. kozo-poljanskii* в местах произрастания представлен разрозненными куртинами вегетативного происхождения, каждую такую куртину расценивали как одну особь.

Таблица 1

Описание пунктов сбора

Пункт	Описание пункта	Координаты
Хмелевое	Корочанский район, окрестности с. Хмелевое	50°53'160'' с. ш. 37°27'246'' в. д.
Ямская Степь	Охранная зона заповедного участка Ямская Степь	51°10'260'' с. ш. 37°37'510'' в. д.
Свистовка	Красненский район, окрестности с. Свистовка	50°58'691'' с. ш. 38°45'766'' в. д.
Озерово	Яковлевский район, окрестности с. Озерово	50°51'048'' с. ш. 36°39'136'' в. д.
Гнездиловка	Прохоровский район, окрестности с. Гнездиловка	50°52'679'' с. ш. 36°57'051'' в. д.
Новохуторное	Красногвардейский район, окрестности с. Новохуторное	50°33'890'' с. ш. 37°11'261'' в. д.
Белая Гора	г. Алексеевка, урочище Белая Гора	50°38'506'' с. ш. 38°39'447'' в. д.
Погромец	Волоконовский район, окрестности с. Погромец	50°21'052'' с. ш. 37°49'355'' в. д.
Конопляновка	Валуйский район, окрестности с. Конопляновка	50°19'497'' с. ш. 37°52'184'' в. д.
Балка Ханова	Новооскольский район, Балка Ханова	50°45'466'' с. ш. 38°02'423'' в. д.

смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (67 мМ трис-НСI (рН 8,8), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 5 мМ β-меркаптоэтанола, 7 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl, 0,25 мМ dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1 единицу Taq ДНК-полимеразы (ингибированной для горячего старта). Реакция

проходила в следующих условиях: «горячий старт» — 2 мин/94 °С, 40 циклов (денатурация — 30 с/94 °С, отжиг праймера — 30 с/55 °С, синтез — 2 мин/72 °С), дополнительный синтез — 10 мин/72 °С, охлаждение — до 4 °С.

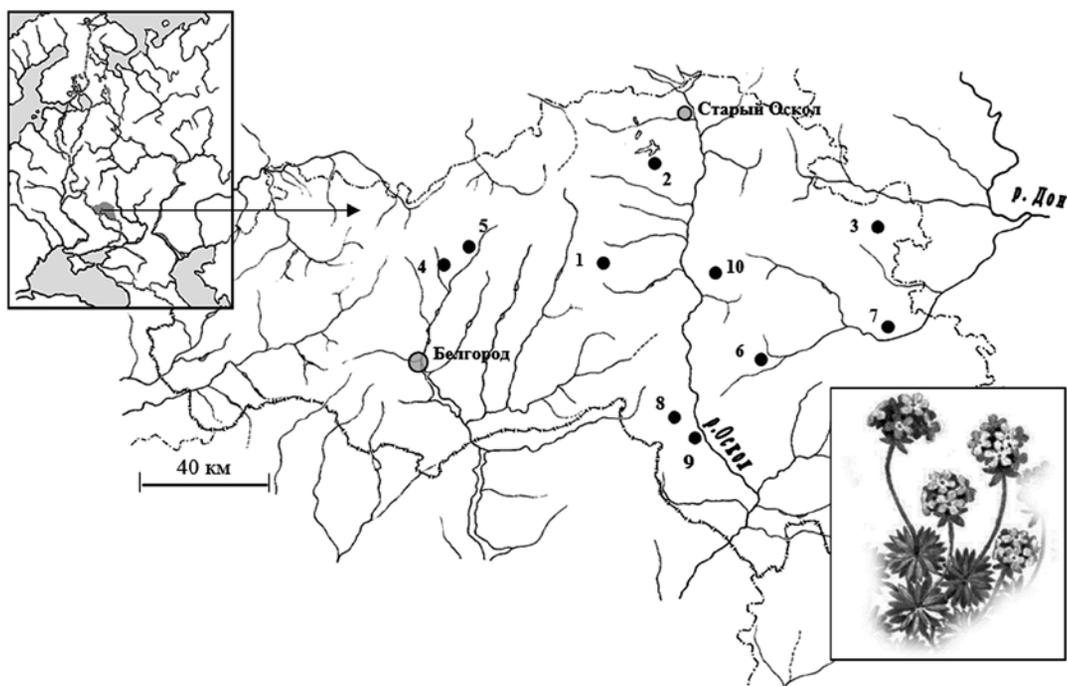


Рис. 1. Пункты сбора *Androsace kozo-poljanskii* в районе исследования

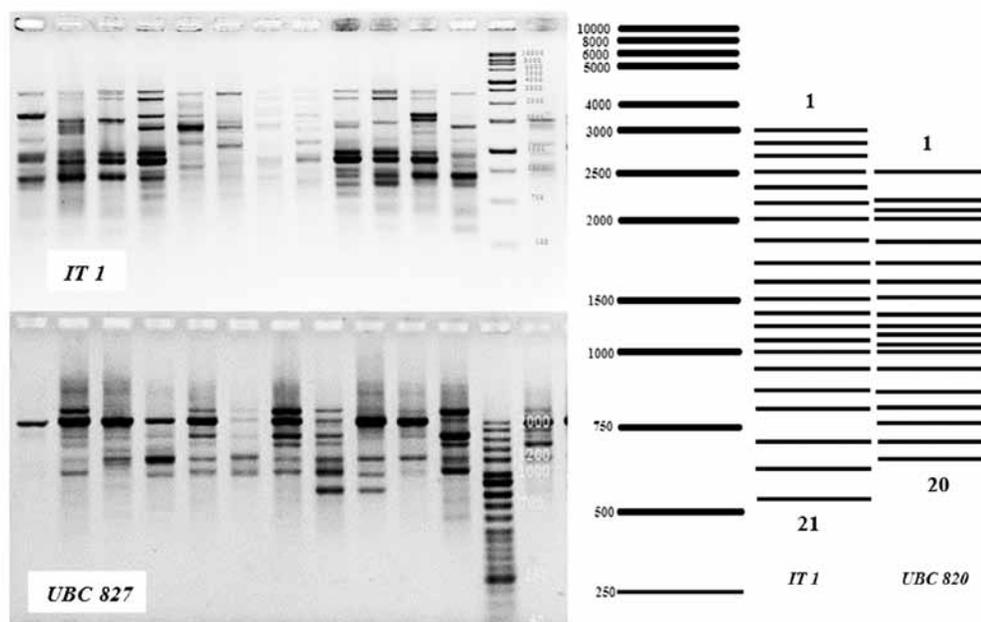


Рис. 2. Слева — ДНК-паттерны, справа — расшифровка ДНК-паттернов *Androsace kozo-poljanskii* (номера обозначены только первые и последние локусы)

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера (охлажденного до +4 °С), 10 В/см — 45 мин. Блоки окрашивали бромистым этидием.

По картинам амплифицированных фрагментов, полученных в ходе электрофореза, составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие «0» (аллель *q*).

У данного вида нами обнаружен 41 локус: 21 — с использованием праймера *IT 1* и 20 — с использованием праймера *UBC 820*. Полученные ДНК-паттерны и их расшифровка приведены на рисунке 2.

Обработка полученных данных проводилась с использованием программы GenAlEx (Peakall, Smouse,

2001), POPGENE 32 (Yeh et al., 2000), MEGA5 (Tamura et al., 2011).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе был проведен тест на нейтральность Эвенса–Ваттерсона (Ewens, 1972; Watterson, 1978; Manly, 1985) используемых локусов, который показал, что по большинству аллелей (в среднем 91 %) нет статистически значимых отличий между наблюдаемой гомозиготностью по Харди–Вайнбергу и гомозиготностью, ожидаемой при нейтральном процессе (табл. 2).

Таблица 2

Результаты теста Эвенса–Ваттерсона. Указаны номера локусов, по которым наблюдаемая гомозиготность отличается от ожидаемой ($p < 0,05$). Данные рассчитывались на основе 1000 симуляций основной выборки

Популяция	Локусы		% нейтральных локусов
	<i>IT 1</i>	<i>UBC 820</i>	
1	3	13	95,1
2	14	15, 20	92,7
3	4, 8	8, 10, 14	87,8
4	нет	14, 15	95,1
5	20, 21	1, 7	90,2
6	14, 19, 21	11, 13, 14, 15, 18	80,5
7	6, 14	нет	95,1
8	20	11, 15, 17	90,2
9	5	8, 16, 17	90,2
10	16	9	95,1
Среднее			91,2 ± 1,5

Оценки ожидаемой гетерозиготности различных локусов и уровня подразделенности популяций, полученные на основе модели М. Неи (Nei, 1975) (табл. 3), также могут давать определенное представление о степени выраженности селективных процессов в изучаемых группах по используемым ДНК-маркерам.

Таблица 3

Показатели генетической дифференциации исследуемых популяций *Androsace kozo-poljanskii* по ДНК-локусам (по Nei, 1975)

Праймер	Локус	Ht	$\bar{H}s$	Gst	Nm
И1	1	0,221	0,138	0,376	0,831
	2	0,212	0,181	0,146	2,919
	3	0,002	0,002	0,010	49,165
	4	0,039	0,038	0,025	19,252
	5	0,125	0,120	0,037	13,076
	6	0,189	0,172	0,092	4,958
	7	0,248	0,215	0,133	3,269
	8	0,201	0,197	0,019	26,150
	9	0,238	0,225	0,054	8,836
	10	0,262	0,254	0,030	16,292
	11	0,249	0,237	0,046	10,294
	12	0,248	0,233	0,063	7,455
	13	0,227	0,210	0,075	6,172
	14	0,066	0,064	0,021	23,815
	15	0,255	0,245	0,042	11,533
	16	0,321	0,304	0,053	8,989
	17	0,158	0,151	0,043	11,278
	18	0,190	0,179	0,057	8,342
	19	0,086	0,083	0,044	10,919
	20	0,088	0,077	0,129	3,368
	21	0,165	0,149	0,098	4,608
UBC 820	1	0,035	0,030	0,140	3,065
	2	0,297	0,271	0,089	5,105
	3	0,025	0,024	0,056	8,376
	4	0,192	0,157	0,182	2,255
	5	0,020	0,020	0,027	18,271
	6	0,403	0,385	0,046	10,446
	7	0,101	0,080	0,207	1,916
	8	0,084	0,079	0,061	7,711
	9	0,050	0,048	0,047	10,251
	10	0,059	0,056	0,046	10,464
	11	0,213	0,154	0,276	1,314
	12	0,340	0,315	0,074	6,232
	13	0,068	0,066	0,041	11,672
	14	0,021	0,020	0,026	18,528
	15	0,049	0,048	0,030	16,115
	16	0,011	0,011	0,033	14,544
	17	0,051	0,045	0,112	3,949
	18	0,002	0,002	0,010	49,165
	19	0,018	0,017	0,037	13,118
	20	0,025	0,024	0,043	11,033
Среднее		0,143 ± 0,012	0,130 ± 0,010	0,091	5,022

Gst — доля межпопуляционного генного разнообразия в общем разнообразии, Ht — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов во всей популяции, $\bar{H}s$ — среднее для всех субпопуляций значение внутрипопуляционного разнообразия, Nm — средний поток генов за поколение

Таблица 4

Показатели генетической гетерогенности популяций *Androsace kozo-poljanskii* по ISSR-маркерам

№ пункта	N	Частота аллелей		P (%)	A	Ae	Ish	He
		p	q					
1	45	0,138	0,862	58,54	1,195 ± 0,153	1,241 ± 0,048	0,240 ± 0,040	0,154 ± 0,028
2	45	0,128	0,872	68,29	1,390 ± 0,143	1,236 ± 0,047	0,247 ± 0,037	0,154 ± 0,026
3	33	0,110	0,890	65,85	1,341 ± 0,147	1,199 ± 0,038	0,227 ± 0,035	0,139 ± 0,023
4	45	0,104	0,896	65,85	1,317 ± 0,150	1,212 ± 0,042	0,232 ± 0,036	0,143 ± 0,025
5	45	0,094	0,906	73,17	1,463 ± 0,140	1,188 ± 0,033	0,230 ± 0,032	0,137 ± 0,021
6	45	0,072	0,928	63,41	1,268 ± 0,152	1,139 ± 0,031	0,170 ± 0,032	0,101 ± 0,021
7	45	0,086	0,914	78,05	1,560 ± 0,131	1,174 ± 0,033	0,219 ± 0,030	0,127 ± 0,020
8	45	0,087	0,913	60,98	1,244 ± 0,151	1,142 ± 0,029	0,183 ± 0,030	0,106 ± 0,019
9	45	0,099	0,901	78,05	1,586 ± 0,126	1,168 ± 0,025	0,227 ± 0,028	0,131 ± 0,018
10	45	0,102	0,898	58,54	1,195 ± 0,153	1,173 ± 0,038	0,199 ± 0,034	0,121 ± 0,023
Среднее		0,092	0,898	67,07 ± 2,31	1,356 ± 0,046	1,187 ± 0,012	0,217 ± 0,011	0,131 ± 0,007

N — количество проанализированных особей, P — процент полиморфных локусов, A — среднее число аллелей на локус, Ae — эффективное число аллелей, Ish — индекс Шеннона, He — ожидаемая гетерозиготность

Известно, что средние величины *Gst* соответствуют уровню генетической дифференциации при селективно-нейтральном процессе. В таком случае локусы с большими значениями *Gst*, вероятнее всего, могут испытывать действие дизруптивного отбора, а локусы с низкими показателями индекса подразделенности подвержены влиянию стабилизирующего отбора (Динамика популяционных генофондов..., 2004). Согласно полученным данным, наибольшая дифференциация между популяциями зафиксирована по локусам *It1-1* и *UBC 820-7, -11*. При этом наиболее изменчивыми были локусы *It1-16* и *UBC 820-6, -12*.

Значения показателей генетической гетерогенности представлены в таблице 4. Данные демонстрируют, что по всем показателям генетического разнообразия популяции достоверно не отличаются друг от друга (при $p=0,05$). Таким образом мы наблюдаем определенное сходство географически изолированных групп проломника.

Можно предположить, что в недавнем прошлом популяционные ареалы данного растения в районе исследования были намного больше и между группами происходил интенсивный обмен генетической информацией, что вело к формированию подразделенной панмиктической популяции в районе исследования, которая в большей степени соответствовала островной модели. Затем, в результате изменения климата и влияния человека,

произошло дробление населения вида на изолированные группы, вплоть до полного прекращения обмена генами между ними. Однако темпы снижения уровня гетерозиготности, вызванные дрейфом генов в результате инбридинга, могли быть одинаковыми в изучаемых популяциях и после их изоляции. Различия, вероятно, были нивелированы большим количеством особей в изучаемых группах (все изучаемые нами популяции представлены обширными зарослями, протяженностью сотни метров и имеющими в своем составе тысячи куртин).

Генетическую близость изучаемых популяций *A. kozo-poljanskii* демонстрирует и анализ молекулярной дисперсии (AMOVA, Excoffier et al., 1992) (табл. 5). Только 14 % изменчивости пришлось на межпопуляционные различия, при этом индекс подразделенности $\Phi_{st} = 0,136$, а уровень потока генов между популяциями $Nm = 1,588$ особи за поколение. Еще более слабую генетическую дифференциацию исследуемых групп проломника показал анализ на основе модели М. Неи (Nei, 1975) (см. табл. 3), согласно которой индекс подразделенности (*Gst*) равен 0,091, а $Nm = 5,022$ особи за поколение.

Стоит отметить, что согласно «теории эволюции со смещающимся равновесием» (Wright, 1970) для поддержания панмиксии в метапопуляции требуется поток генов 1–2 особей за поколение. В нашем случае, несмотря на высокие оценки *Nm*, вряд ли можно говорить об интенсивном обмене генами между изолированными

Таблица 5

Результат анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) по ДНК-локусам в популяциях *Androsace kozo-poljanskii*

Источник изменчивости	df	SS	MS	V	%	Φ_{st}	p	Nm
Между популяциями	9	277,877	30,875	0,616	14	0,136	0,001	1,588
Внутри популяций	428	1677,354	3,919	3,919	86			
Итого	437	1955,231	34,794	4,535	100			

Таблица 6

Попарные оценки генетической дифференциации (Φst) между исследованными популяциями *Androsace kozo-poljanskii* по ISSR-локусам

Пункт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
2	0,185		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
3	0,243	0,163		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
4	0,204	0,101	0,160		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
5	0,127	0,116	0,112	0,078		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
6	0,229	0,157	0,101	0,165	0,091		0,001	0,001	0,001	0,001
7	0,264	0,181	0,083	0,167	0,121	0,064		0,001	0,001	0,001
8	0,221	0,153	0,066	0,139	0,092	0,070	0,075		0,001	0,001
9	0,196	0,100	0,045	0,094	0,063	0,044	0,067	0,043		0,001
10	0,219	0,099	0,203	0,113	0,091	0,166	0,177	0,182	0,113	

Под диагональю приведены оценки Φst , а над диагональю — уровень их значимости

группами проломника (межпопуляционные географические дистанции здесь варьируют от 4 до 140 км). Такую общую схожесть генетической структуры, вероятно, можно объяснить либо сходными векторами естественного отбора, происходящими в популяциях, связанных единой ландшафтной структурой, либо их сравнительно недавним разобщением.

Степень генетической близости между изучаемыми популяциями *A. kozo-poljanskii* показывают также попарные оценки генетической дифференциации Φst (табл. 6). Согласно полученным данным наиболее оригинальной и отличной от других популяций является группа из окрестностей с. Хмелевое (пункт 1).

Аналогичный результат демонстрируют результаты кластерного анализа на основе генетических расстояний (Nei, 1978) невзвешенным парногрупповым ме-

тодом (UPGMA) (рис. 3), а также полигоны Дебеца, построенные по частотам q -аллеля (рис. 4). При этом выявляется одна закономерность. Наибольшее генетическое сходство наблюдается между группами, располагающимися в одних и тех же долинах рек или их притоков. Например, пункты Погромец (№ 8) и Конопляновка (№ 9) располагаются в долине реки Оскол, пункты Озерово (№ 4) и Гнездиловка (№ 5) — в долине реки Северский Донец, пункты Белая Гора (№ 7) и Новохуторное (№ 6) — в долине реки Тихая Сосна. При этом довольно обособленная группа из окрестностей с. Свистовка (№ 3) оказалась в «оскольском» кластере. Группы, обитающие в бассейне реки Оскол, популяции Ямская Степь (№ 2) и Балка Ханова (№ 10) оказались также генетически близки (хотя и удаленными от других групп этого бассейна № 8 и 9), а популяция Хмелевое

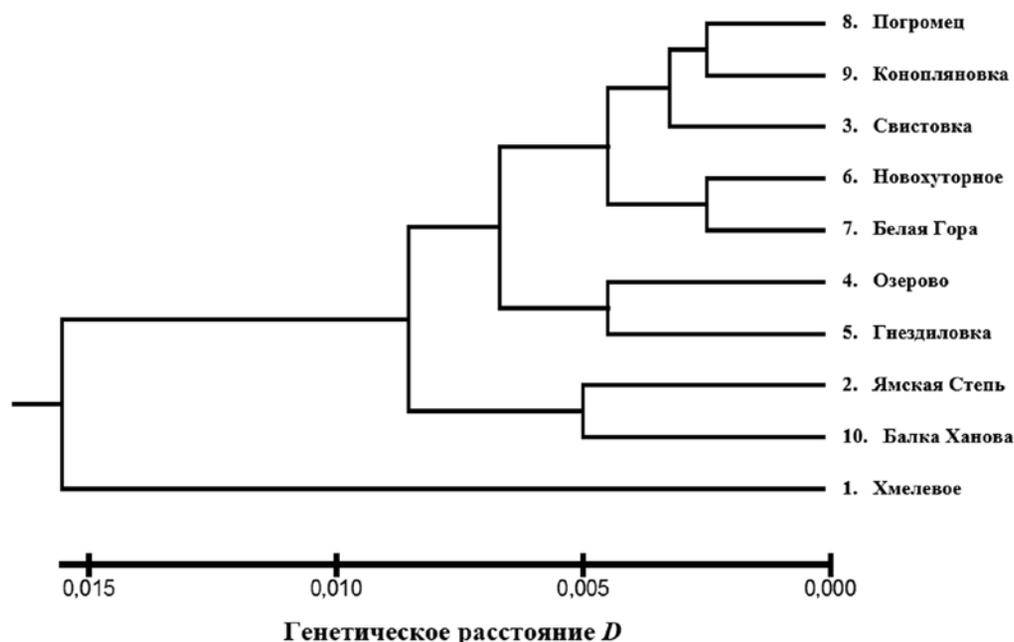


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний по Неи (Nei, 1972) (UPGMA) между популяциями *Androsace kozo-poljanskii*

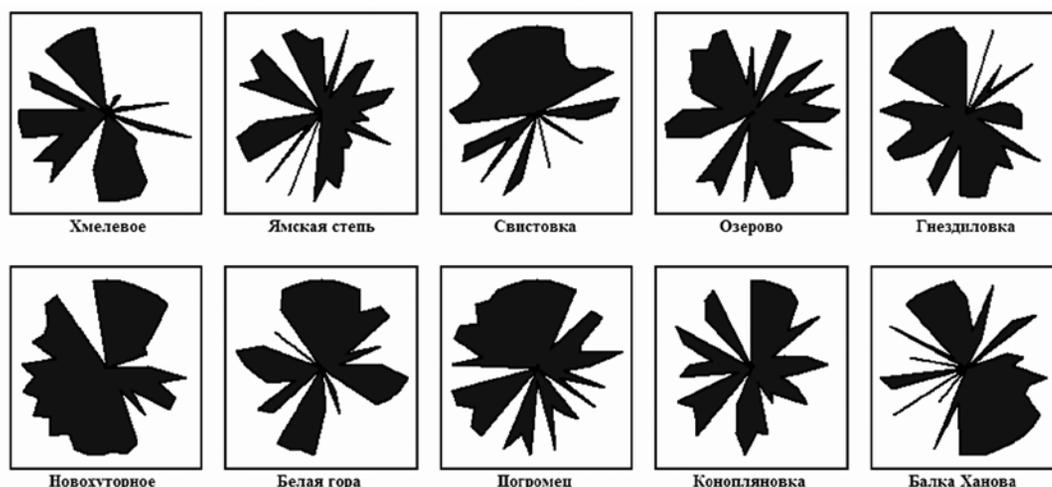


Рис. 4. Полигоны Дебеца, построенные по совокупности частот q -аллеля 41-го локуса ДНК в популяциях *Androsace kozo-poljanskii*

(№ 1) по соотношению частот аллелей дистанцировалась от всех изученных групп.

Тем не менее, несмотря на указанное выше расположение, географическая близость популяций не являлась решающим фактором, обуславливающим близость генетическую. То есть относительно большая генетическая дистанция наблюдалась как между географически близко расположенными группами, так и удаленными. Данный вывод подтверждается графиком прямой линейной регрессии (рис. 5), который демонстрирует слабую корреляцию ($r = -0,276$) между логарифмами географических расстояний G между популяциями и логарифмами попарных показателей уровня потока генов Nm между ними, вычисленными через попарные индексы дифференциации F_{st} . Это демонстрирует нарушение модели изоляции расстоянием в популяционной струк-

туре *A. kozo-poljanskii* и усиление роли стабилизирующего отбора в его популяциях.

В этой связи стоит отметить следующее. Выявленная генетическая близость между популяциями, относящимися к одним и тем же бассейнам рек, может свидетельствовать о том, что в прошлом расселение проломника, вероятно, проходило по речным долинам, в результате чего сформировались панмиктические группы, приуроченные к данным элементам ландшафта³. После дальнейшего дробления популяционных ареалов оставшиеся группы сохранили сходный аллельный набор. В результате популяции, находящиеся рядом, но в разных речных долинах, оказались более генетически различными, чем геогра-

³ Перенос семян и пыльцы через гористые водоразделы, вероятно, был менее интенсивным.

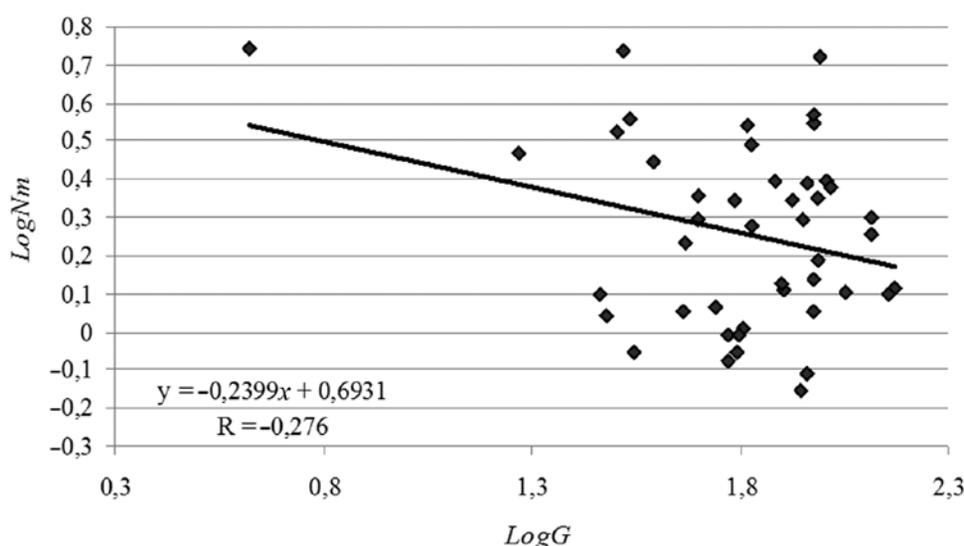


Рис. 5. Линейная регрессия логарифма потока генов Nm между парами популяций *Androsace kozo-poljanskii* на логарифм географического расстояния между ними G

Таблица 7

Количество отмеченных мультилокусных генотипов и оценки потенциального генетического разнообразия, полученные разными методами для исследованных популяций *Androsace kozo-poljanskii*

Праймер	Популяция	N_{MLG}	N_{MLG-1}	Метод			
				Chao1-bc		1st order jackknife	
				$N_{max} \pm SE$	95 % CI	$N_{max} \pm SE$	95 % CI
<i>It1</i>	1	45	43	1013 ± 291,9	588,0–1770,8	89,0 ± 9,3	74,2–111,4
	2	45	37	1013 ± 291,9	588,0–1770,8	89,0 ± 9,3	74,2–111,4
	3	33	28	545,0 ± 181,0	294,3–1036,3	65,0 ± 7,9	52,8–84,7
	4	44	39	485,5 ± 260,2	194,4–1331,6	86,0 ± 9,1	71,6–108,0
	5	44	42	485,5 ± 260,2	194,4–1331,6	86,0 ± 9,1	71,6–108,0
	6	43	36	310,3 ± 152,6	137,4–800,0	83,1 ± 8,9	69,1–104,6
	7	41	33	171,2 ± 68,8	90,3–385,3	77,2 ± 8,5	64,0–97,9
	8	43	34	310,3 ± 152,6	137,4–800,0	83,1 ± 8,9	69,1–104,6
	9	42	32	843,8 ± 253,6	479,8–1510,5	82,1 ± 8,9	68,1–103,6
	10	36	25	142,3 ± 61,5	73,1–340,9	65,3 ± 7,6	53,8–84,4
<i>UBC820</i>	1	14	7	21,3 ± 8,0	15,3–55,7	19,9 ± 3,4	16,0–30,9
	2	15	9	20,1 ± 5,3	16,0–42,1	21,8 ± 3,7	17,5–33,4
	3	17	10	27,9 ± 9,3	19,6–63,4	26,7 ± 4,4	21,2–39,5
	4	28	14	65,2 ± 23,4	40,0–143,5	47,6 ± 6,2	38,6–63,9
	5	18	8	29,0 ± 9,4	20,6–64,7	27,8 ± 4,4	22,2–40,7
	6	17	9	34,9 ± 14,8	21,4–90,5	27,8 ± 4,6	21,8–41,1
	7	32	17	125,4 ± 54,4	64,7–302,1	60,4 ± 7,4	49,3–78,9
	8	19	4	44,4 ± 19,6	25,7–116,1	31,7 ± 5,0	25,0–45,8
	9	28	18	69,1 ± 25,5	41,4–153,6	48,5 ± 6,4	39,3–65,2
	10	25	14	55,9 ± 19,6	35,3–122,5	43,6 ± 5,9	35,3–59,4

фически более удаленные популяции, но находящиеся в одной долине. Кроме того, нельзя исключать того, что перенос пыльцы и семян вдоль речных долин проходит в настоящее время, что обуславливает ограниченный поток генов между некогда едиными, а ныне разделенными популяциями проломника. Однако последний вывод требует определенной доли осторожности и экспериментального подтверждения возможности переноса семян и пыльцы этого растения на столь большие расстояния.

Ввиду того что для анализа жизнеспособности популяций *A. kozo-poljanskii* были использованы выборки ограниченной численности, содержащие лишь небольшую часть популяционного аллелофонда, нами был проведен анализ мультилокусной изменчивости. Для этого были рассчитаны мультилокусные комбинации для каждой из 438 особей. Затем в каждой группе было оценено общее количество мультилокусных генотипов (N_{MLG}) и число уникальных мультилокусных генотипов (N_{MLG-1}), т. е. тех комбинаций, которые были отмечены в одной-единственной выборке. В дальнейшем, основываясь на распределении частот мультилокусных генотипов, для каждой популяции было вычислено потенциальное генетическое разнообразие, ожидаемое при увеличении объема выборки до бесконечности (N_{max}). Анализ проводили с помощью двух непараметрических методов: метод Chao1-bc (bias-corrected form for the Chao1)

(Chao, 2005) и метод «сломанного ножа» первого порядка (1st order jackknife) (Burnham, Overton, 1978). Все расчеты были проведены с помощью программы SPADE (Chao, Shen, 2009). Результаты анализа мультилокусных генотипов представлены в таблице 7.

Анализ продемонстрировал, что общее количество мультилокусных генотипов, количество уникальных комбинаций и, соответственно, максимально возможное количество комбинаций значительно выше по праймеру *It1*. Стоит отметить, что И.И. Шмальгаузен (1968) назвал аллельное разнообразие «мобилизационным резервом» популяции, обеспечивающим ей более стабильное существование во времени. По нашим данным, среди изученных популяций наиболее потенциально богатым генофондом обладают группы из окрестностей с. Хмелевое (№ 1) и из заповедного участка Ямская Степь (№ 2). Самой мноморфной оказалась группа Балка Ханова (№ 10).

Мультилокусные генотипы, полученные с помощью праймера *UBC820*, оказались более однообразными. Среди изученных популяций по этому праймеру наиболее полиморфной оказалась популяция Белая Гора (№ 7), а самой мноморфной — популяция Гнездиловка (№ 5).

Стоит отметить, что при объединении комбинаций, полученных при использовании обоих праймеров, нам не удалось получить значимых отличий между популяци-

ями. Фактически в каждой группе количество отмеченных комбинаций (N_{MLG} и N_{MLG-1}) было равно объему выборки, и максимально возможное число мультилокусных генотипов стремилось к бесконечности.

Очень важной проблемой, решаемой в ходе мониторинговых мероприятий, проводимых в природоохранном аспекте, является оценка эффективной численности популяций изучаемых видов, т. е. минимальной численности, необходимой для выживания вида. С генетической точки зрения под эффективной численностью понимают численность идеальной популяции, в которой уровень дрейфа генов соответствует таковому в реальной популяции (Wright, 1931). Именно такое понимание эффективной численности позволяет более объективно подходить к разработке программ по сохранению видообразия. Кроме того, эти знания очень полезны для контроля за искусственным разведением, а также для изучения эволюционных процессов, происходящих в естественных популяциях.

В своей оценке эффективной численности мы использовали два подхода.

Первый способ расчета основан на коэффициентах линейной функции между попарными оценками потока генов (Nm) и географического расстояния между популяциями (G):

$$\log Nm = a + b \cdot \log G.$$

М. Слаткин (Slatkin, 1993) показал, что эффективную численность популяции (для всех исследованных популяций в целом) можно получить как $Ne = 10^a$, где a — коэффициент, полученный в уравнении. Исходя из уравнения, приведенного на рисунке 5, эффективная численность (Ne) оказалось равной 4,9 особи.

Несколько иной результат был получен при вычислении эффективной численности с помощью интегральной модели, основанной на значениях индекса подразделенности популяции (Wright, 1951):

$$Fst = \frac{1-t_k}{1+t_k},$$

$$\text{где } t_k = \exp \left\{ \left(\frac{1}{Ne} \right) [\ln(K-0,5) + 0,5772] + \left(\frac{1}{2 \cdot Ne^2} \right) \left[1,6449 - \frac{2}{2 \cdot K - 1} \right] + \left(\frac{1}{3 \cdot Ne^3} \right) \left[1,202 - \frac{2}{(2 \cdot K - 1)^2} \right] \right\},$$

где K — количество использованных популяций.

Ввиду того что для определения степени подразделенности популяций в данной работе нами вместо индекса Fst было задействовано два других интегральных и взаимозаменяемых показателя Gst и Φst , мы сочли

возможным модифицировать указанную формулу, внося в нее поочередно значения этих индексов. В результате эффективная численность (Ne), вычисленная по индексу Gst , оказалась равной 20,4 особи, а по индексу Φst — 13,7 особи, что значительно больше, чем аналогичное значение, вычисленное по уравнению регрессии (4,9). Тем не менее полученные оценки эффективной численности входят в диапазон эффективного размера популяций, рассчитанного для травянистых растений (от 3 до 282 особей) (Silvertown, 1993).

Полагаем, что полученные результаты могут быть полезными в ходе наблюдений за состоянием популяций *A. kozo-poljanskii*, а также возможной интродукции этого вида с целью его восстановления в элементах ландшафта юга Среднерусской возвышенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов Н.П., Голицын С.В. «Сниженные Альпы» и тимьянники Среднерусской возвышенности // Ботанический журн. — 1954. — Т. 39. — № 3. — С. 423–430. [Vinogradov NP, Golitsyn SV. Snizhennye-allypy-i-timyanniki-srednerusskoj-vozvyshennosti. *Botanical Journal*. 1954;39(3):423-430. (In Russ).]
2. Голицын С.В. К флоре восточного крыла Верхнего Поосколья // Ботанический журнал СССР. — 1956. — № 10. — С. 1428–1438. [Golitsyn SV. To the flora of the eastern wing of the Upper Prioskolie. *Botanical Journal of the USSR*. 1956(10):1428-1438. (In Russ).]
3. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. [The population dynamics of the gene pools in the anthropogenic impacts. Ed by Y.P. Altukhova. Moscow: Nauka; 2004. (In Russ).]
4. Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. — М.: Наука, 1968. [Shmal'gauzen II. The factors of evolution. The theory of stabilizing selection. Moscow: Nauka; 1968. (In Russ).]
5. Burnham KP, Overton WS. Estimation of the size of a closed population when capture probabilities vary among animals. *Biometrika*. 1978;(65):625-633.
6. Chao A. Species richness estimation. In: Balakrishnan N, Read CB, Vidakovic B, editors. *Encyclopedia of Statistical Science*. New York: Wiley; 2005. P. 7907-7916.
7. Chao A, Shen T-J. SPADE. 2009. <http://chao.stat.nthu.edu.tw>.
8. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;(131):479-491.
9. Ewens W. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor Pop Biol*. 1972;(3):87-112.
10. Manly BFJ. *The Statistics of Natural Selection on Animal Populations*. London: Chapman and Hall; 1985.

11. Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 1972;106(949):283-292.
12. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam; 1975.
13. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. 2001. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.
14. Slatkin M. Isolation by distance in equilibrium and non – equilibrium populations. *Evolution*. 1993;47(1):294-279.
15. Silvertown J, Lovett Doust J. Introduction to plant population biology. Blackwell Scientific. Oxford; 1993; 210 p.
16. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011. <http://www.kumarlab.net/publications>.
17. Watterson G. The homozygosity test of neutrality. *Genetics*. 1978;88:405-417.
18. Wright S. Isolation by distance. *Genetics*. 1943;28:114-138.
19. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics*. 1951;(15):323-354.
20. Yeh FC, Yang R, Boyle TJ, et al. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. 2000. http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html.
21. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994;20(2):176-181.

THE GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF SPECIALLY PROTECTED SPECIES ANDROSACE KOZO-POLJANSKII OVSZ. IN CONDITIONS OF THE SOUTH AT THE CENTRAL RUSSIAN UPLAND USING DNA MARKERS

E.A. Snegin, E.A. Snegina, T.A. Novomlinskaya

✿ **SUMMARY:** At the basis of DNA markers (ISSR) the state of the gene pools of ten populations (438 individuals) specially protected relict plant species *Androsace kozo-poljanskii Ovsz.* Seu *Androsace villosa* subsp. *Koso-poljanskii* Fed. in Southern Central Russian Upland was studied. The data demonstrated a low level of genetic heterogeneity of populations ($Ish = 0,217 \pm 0,011$; $He = 0,131 \pm 0,007$), as well as a slight degree of the genetic fragmentation ($\Phi st = 0,136$, $Gst = 0,091$), despite the strong geographical isolation. An analysis of multilocus genotypes (methods Chao1-bc and the 1st order jackknife) revealed the group with a potentially large number and low genetic combinations. There was a low correlation between the logarithms of the level of gene flow and geographic distances between populations ($r = -0,276 \pm 0,141$), which constitutes a violation of the isolation by distance model and strengthening of the role of stabilizing selection. It has been hypothesized of preferential settling of the studied species in the past, along the river valleys. The effective population size (N_e), which calculated on the basis of index units and regression equations were in the range of 4.9–20.4 individuals.

✿ **KEYWORDS:** herb; relict species; population gene pool; anthropogenic changes landscape.

✿ Информация об авторах

Эдуард Анатольевич Снегин — д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой экологии, физиологии и биологической эволюции. Белгородский государственный национальный исследовательский университет. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

Елена Андреевна Снегина — лаборант кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции. Белгородский государственный национальный исследовательский университет. E-mail: snegina@bsu.edu.ru.

Татьяна Александровна Новомлинская — магистрант кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции. Белгородский государственный национальный исследовательский университет. E-mail: snegina@bsu.edu.ru.

Edward A. Snegin — Dr.Biol.Sci., the senior lecturer, the head of department of ecology, physiology and biological evolution. Belgorod national research university. E-mail: snegin@bsu.edu.ru.

Elena A. Snegina — assistant of department of ecology, physiology and biological evolution. Belgorod national research university. E-mail: snegina@bsu.edu.ru.

Tatiana A. Novomlinskaya — undergraduate of department of ecology, physiology and biological evolution. Belgorod national research university. E-mail: snegina@bsu.edu.ru.