УДК 582.949.2-155.3: 575.17(476)

ПРОСТРАНСТВЕННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МЕТАПОПУЛЯЦИИ *MELITTIS SARMATICA* KLOK. (LAMIACEAE) НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛКОВЫССКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ (БЕЛАРУСЬ)

А.В. Шевкунова[1], О.Ю. Урбанович[2]

([1]ГНУ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси; [2]ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; e-mail: a.shevkunova@mail.ru)

Исследована пространственно-генетическая структура метапопуляции *Melittis sarmatica* Klok. на территории Волковысской возвышенности (Гродненская обл., Беларусь). Для генетического анализа сходства популяций в пределах метапопуляции использован RAPD-метод. Выявлен обмен генетической информацией между компонентами метапопуляции. Установлены наиболее устойчивые связи, узловые и проблемные элементы ее структуры, выделены отдельные генетически обособленные группы. Наблюдается отрицательная линейная зависимость степени генетического сходства популяций от расстояния между ними.

Ключевые слова: *метапопуляция, Melittis sarmatica, RAPD-анализ.*

Комплексы популяций многих видов редких и исчезающих растений имеют сложную пространственную структуру. В первую очередь это относится к видам, которые поселяются на дискретных и специфических субстратах, а также занимают экотонные участки с определенной степенью нарушенности напочвенного покрова и ослабленными конкурентными взаимоотношениями. Кроме того, вырубки, строительство дорог и другие виды деятельности человека часто приводят к фрагментации некогда единых популяций. В связи с этим особое развитие при изучении динамики популяций редких и исчезающих видов растений получил метапопуляционный подход. Метапопуляция — это совокупность локальных популяций, дискретных (или относительно дискретных) в пространстве, взаимодействующих друг с другом путем расселения диаспор или генетического потока [1]. Обычно в качестве метапопуляции выступает комплекс локальных популяций того или иного вида в пределах ландшафта, крупного лесного массива и т.п. Важным условием изучения пространственной структуры метапопуляции является применение методов генетического анализа.

Объекты и методы исследования

На территории Волковысской возвышенности (Гродненская обл. Республики Беларусь) нами была исследована пространственно-генетическая структура метапопуляции *Melittis sarmatica* Klok. — редкого вида, включенного в Красную книгу Республики Беларусь. *M. sarmatica* — неморальный вид, приуроченный к дубовым, дубово-сосновым, грабовым и березовым лесам, предпочитающий полутеневые условия и поселяющийся на опушках, вдоль просек и лесных дорог. Это насекомоопыляемое растение, размножающееся в естественных условиях исключительно семенами.

Для выявления пространственно-генетической структуры, анализа сходства локальных популяций *M. sarmatica* в пределах метапопуляции был применен RAPD-метод с использованием 12 праймеров. Материалом для исследования служили листья *M. sarmatica,* отобранные из 16 локальных популяций, выявленных на общей площади 250 км^2. Из них 13 популяций были расположены в пределах одного крупного лесного массива (Замковый лес).

Препараты ДНК выделяли с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы “Fermentas” согласно рекомендованному протоколу. Реакцию амплификации проводили с помощью набора из 12 RAPD-маркеров (таблица). Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 20 мкл имела следующий состав: 67 мМ

Название и последовательность использованных праймеров

№	Название праймеров	Последовательность праймеров
1	Apr2.2	TCG CCC CAT T
2	Apr 2.3	AGT TCG TCT G
3	Apr 2.5	CTC ACC GTC C
4	Apr 2.7	GCA ACT ACG T
5	Apr 2.8	CTC GAG GTA A
6	Apr 2.10	TCC GAC AAG A
7	Apr 2.11	CAC CAT CCA A
8	Opa5	AGG GGT CTT G
9	Opa20	AGG TCT TGG G
10	Ubc73	GGG CAC GCG A
11	Ubc248	GAG TAA GCG G
12	Ubc290	CCG CGA GCA C

Трис-HCl pH 8,8, 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ dNTP, 250 нМ праймера, 50 мкг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Условия проведения реакции: 94° — 4 мин; 40 циклов 94° — 45 с, 37° — 45 с, 72° — 2 мин; 1 цикл: 72° — 10 мин. Продукты амплификации разделяли в 1%-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания бромистым этидием. В качестве маркера молекулярного веса использовали GeneRuler^{tm} 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Дендрограмма генетического сходства была получена с помощь программы Treecon, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li с применением метода UPGMA [2].

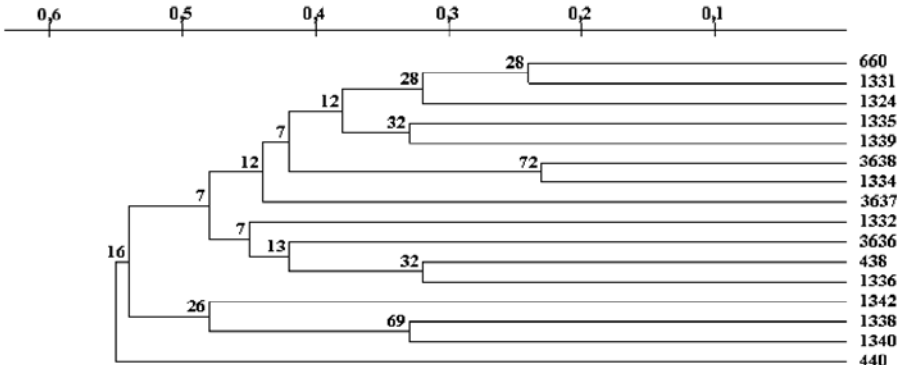

Рис. 1. Дендрограмма генетических расстояний между популяциями *M. sarmatica*. Цифры на ветвях обозначают значения бутстреп-поддержки

Результаты и их обсуждение

В результате проведения RAPD-анализа индивидуальных растений *M. sarmatica* с 12 маркерами было выявлено 66 полиморфных фрагментов среди 16 образцов длиной от 200 до 3000 п.н. Каждое растение характеризовалось индивидуальным набором фрагментов амплификации, что позволило различить образцы на молекулярном уровне. Данные RAPD-анализа были использованы для построения дендрограммы генетического сходства. Показано, что исследованные образцы *M. sarmatica* находятся на

Рис. 2. Карта расположения локальных популяций *M. sarmatica* в составе метапопуляции и схема связей между ними (граф пространственно-генетической структуры метапопуляции). Обозначения: ● — локальная популяция, ▬ — сильная связь (генетическое сходство — 81—90%), ── — средняя связь (генетическое сходство — 70—80%)

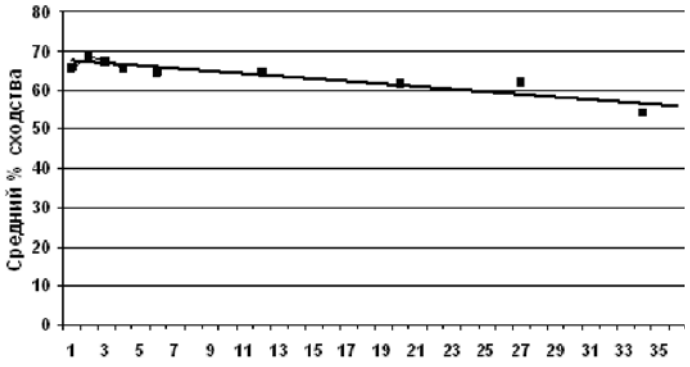

Рис. 3. Зависимость генетического сходства локальных популяций *M. sarmatica* в составе метапопуляции от расстояния между ними

разном генетическом расстоянии друг от друга, которое варьирует от 0,23 до 0,55 (рис. 1). Образец 440, собранный на наибольшем расстоянии от других образцов, максимально удален и на генетическом уровне. Популяции можно разделить на 5 генетически обособленных групп. Наиболее близкими оказались популяции 3638 и 1334, 660 и 1331, генетические расстояния между которыми находятся в пределах от 0,23 до 0,24.

Так же был построен граф пространственно-генетической структуры метапопуляции со связями внутри (рис. 2). Под связью понимается генетическое сходство между популяциями. Сила связи рассчитывалась как среднее от процента совпадений в матрице состояний бинарных признаков по каждому праймеру. Анализ полученных данных показал, что в пределах метапопуляции идет обмен генетической информацией. Отдельные локусы (ценопопуляции), произрастающие в различных ценозах, связаны между собой как пространственно, так и генетически. Четкого пространственного разграничения групп не наблюдается, что может быть связано с расположением популяций в пределах одного ландшафта.

Анализ типов связей между локальными популяциями показал, что наиболее сильные связи наблюдаются в парах популяций 660-1339, 660-1335, 1335-1339, 3638-1334, 1338-1340 и 438-1336. Первые 4 пары находятся в пределах одного лесного массива, в последних двух парах популяции удалены друг от друга (на 13 и 20 км соответственно). Таким образом, можно предположить, что существует возможность дальнего переноса и обмена генетической информацией между локальными популяциями, разделенными значительным расстоянием (более 20 км). К узловым элементам метапопуляции, имеющим наибольшее количество связей, относятся популяции 1335, 1339, 660 и 1324. Проблемными элементами метапопуляции, имеющими 1—2 значимые связи с другими популяциями, являются популяции 1338, 1342, 3638, 1332, 1334. Популяция 440 имеет только слабые связи, возможно, она является частью другой метапопуляции (рис. 2).

Среди исследуемых образцов *M. sarmatica* выявлена отрицательная линейная зависимость степени генетического сходства популяций от расстояния между ними, рассчитанная по формуле: $y = -0{,}33x + 67{,}7$ ($p < 0{,}05$), где y — степень генетического сходства популяций (%), x — расстояние между локальными популяциями (км) (рис. 3).

Выводы

Метапопуляционный подход позволяет адекватно описывать сложную структуру связей между ботаническими объектами (локальными популяциями) в пределах ландшафта. Для установления пространственно-генетической структуры метапопуляции перспективно использовать молекулярные методы исследования, в частности RAPD-метод, что позволяет оценить степень обмена генетической информацией между ее компонентами. В метапопуляции, компоненты которой расположены в пределах одного ландшафта, может не наблюдаться четкого пространственного отграничения групп популяций, входящих в разные генетические кластеры, хотя отрицательная линейная зависимость степени генетического сходства популяций от расстояния между ними существует. Полученные данные являются важной фактографической основой для оценки состояния и прогнозирования поведения популяций редких и исчезающих видов растений на региональном уровне в условиях антропогенной трансформации природных комплексов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hanski I., Gaggiotti O.* Ecology, genetics and evolutin of metapopulations. London: Elsevier Academic Press, 2004. 696 p.

2. *Nei M., Li W.H.* Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76. P. 5269—5273.

Поступила в редакцию
09.04.10

SPATIAL GENETIC STRUCTURE OF THE METAPOPULATION OF *MELITTIS SARMATICA* KLOK. (LAMIACEAE) ON THE TERRITORY OF VOLKOVYSK ELEVATION (BELARUS)

A.V. Shevkunova, O.Y. Urbanovich

The spatial genetic structure of the metapopulation of *Melittis sarmatica* Klok. on the territory of Volkovysk Elevation (Grodno region of Belarus) was investigated. The RAPD method used for genetic analysis of similarity of populations within the metapopulation revealed exchange of genetic information between matapopulation components. The most stable links, main and problem elements in its structure and some genetically separate groups were revealed. There was a negative linear dependence of the degree of genetic similarity of populations from the distance between them.

Key words: *metapopulation, Melittis sarmatica, RAPD-analysis.*

Сведения об авторах

Шевкунова Анастасия Владимировна — мл. науч. сотр. ГНУ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси. Тел. +37517-284-20-25; e-mail: a.shevkunova@mail.ru

Урбанович Оксана Юрьевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Тел. +37517-284-19-08; e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by