

АНДРЕЕВ И.О. ¹, БУБЛИК Е.Н. ¹, МОСУЛА М.З. ², СПИРИДОНОВА Е.В. ¹,
ДРОБЫК Н.М. ², КУНАХ В.А. ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка,

Украина, 46027, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2, e-mail: n.drobyk@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТАЦИИ АРЕАЛА НА ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ДВУХ РЕДКИХ ВИДОВ ФЛОРЫ УКРАИНЫ *GENTIANA LUTEA* L. И *IRIS PUMILA* L.

Бурный рост численности населения наряду с ускорением технического прогресса в промышленности и сельском хозяйстве на протяжении последних столетий привели к превращению огромных природных территорий в антропогенные ландшафты, что стало причиной сокращения и фрагментации ареалов многих видов, изменило структуру, характер распространения и функционирования большинства природных экосистем [1]. Фрагментация природной растительности – сегодня одно из наиболее распространенных изменений в наземных экосистемах планеты, которое является одной из главных угроз сохранения биоразнообразия в современном мире [2].

Фрагментация ареала имеет три главных последствия для популяций растений: потеря пригодной для обитания территории, уменьшение размера популяций и рост пространственной изоляции остаточных популяций [3]. Эти изменения часто ведут к уменьшению эффективного размера популяций и нарушению экологических и генетических процессов [4, 5]. В небольших изолированных популяциях количество аллелей может уменьшаться вследствие генетического дрейфа и инбридинга, которые неизбежны из-за сокращения эффективного размера и ограниченности потока генов между изолированными популяциями. Следствием этого является потеря генетического разнообразия, которая, в свою очередь, ведет к снижению жизнеспособности отдельных особей и эволюционного потенциала популяций [4, 5].

Вместе с тем, накопленные к настоящему моменту данные все еще не позволяют сделать однозначного вывода о степени негативных последствий фрагментации ареала для генетического разнообразия вида. Очевидно проблема сложнее, чем выглядит на первый взгляд, и для своего решения требует учета ряда дополнительных факторов, в частности особенностей биоло-

гии вида, временного интервала с момента нарушения целостности ареала, особенностей окружающих ландшафтов, в которые «вкраплены» остаточные популяции вида, и др. Кроме того, остается нерешенным вопрос о том, что является первопричиной исчезновения вида: потеря генетического разнообразия вследствие сокращения и фрагментации ареала, или же экологические и демографические факторы.

В данной работе с целью выявления факторов, которые могут повлиять на уровень генетического разнообразия в условиях сокращения численности и фрагментации ареала, мы обобщаем результаты исследований генетического разнообразия двух видов растений – представителя степной флоры ириса карликового, *Iris pumila* L., и альпийского вида горечавки желтой, *Gentiana lutea* L. Хозяйственная деятельность человека привела к существенному сокращению ареала и численности этих видов на территории Украины. Оба вида отнесены к редким, а горечавка желтая включена в Красную книгу Украины [6].

Материалы и методы

Для популяционно-генетического анализа использованы растения *I. pumila* (в количестве $n = 49$) из пяти природных популяций, географическое размещение которых охватывает широты от южного Крыма до северной границы ареала вида: окрестности с. Мигия (Первомайский р-н, Николаевской обл., $n = 11$), полуостров Аляуды (г. Николаев, $n = 9$), окр. с. Коларово (Октябрьский р-н, Николаевской обл., $n=10$), окр. с. Андреевка (Полтавский р-н, Полтавская обл., $n = 10$), окр. Балаклавы (г. Севастополь, АР Крым, $n = 9$). В исследованиях *G. lutea* были использованы 86 растений из пяти природных популяций Украинских Карпат (горы (гг.) Шешул-Павлик (Sh, $n = 15$), полонина (пол.) Лемская (Lem, $n = 15$), г. Гутин Томнатик (НТ, $n = 11$), гг. Тро-

яска-Татарука (Tr, n = 15), пол. Крачунеска (Kг, n = 15)) и одной интродуцированной популяции с г. Пожижевская (Pozh, n = 15). Популяции Tr и Kг расположены на хребте (хр.) Свидовец (1500–1730 м н.у.м.), а Lem, Pozh, HT, и Sh – на хр. Черногора (1400–1950 м н.у.м.). Характеристики изученных популяций приведены в работах [7–10].

Для выделения ДНК использовали ткань листовых пластинок растений. ДНК выделяли из свежего или гербарного материала по стандартной методике с СТАВ [11]. Условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последовательности использованных праймеров приведены в [7, 12 см. Suppl. 1].

Порядок проведения статистической обработки данных и расчета основных показателей генетического разнообразия описан в [7, 9].

Результаты и обсуждение

Результаты анализа генетического разнообразия *I. pumila*. В результате ПЦР-анализа 49 образцов *I. pumila* из пяти природных популяций с применением 7 ISSR-праймеров было учтено 222 фрагмента, 97,8 % из которых были полиморфными (табл. 1). Доля полиморфных фрагментов (P) колебалась от 39,6 % (Балаклава) до 56,3 % (Мигия), в среднем – 46,0 %. Значение этого показателя для остальных трех популяций было близко к среднему значению для пяти популяций. Часть ампликонов оказались уникальными для отдельных популяций, больше всего таких ампликонов обнаружено в популяции Балаклава (18 %), меньше всего – в популяции Аляуды (2,6 %). Доля фиксированных ампликонов (присутствующих у всех проанализированных особей в популяции, то есть имеющих час-

тоту 1,0) была наивысшей в популяции Коларово (14,7 %), а в других составляла от 8,8 % до 12 %.

По результатам ПЦР-анализа были рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма популяций *I. pumila*, которые составили: индекс Шеннона (S) – 0,230–0,171, в среднем – 0,188, несмещенное генное разнообразие Нея (ожидаемая гетерозиготность, H_e) – 0,111–0,150, в среднем – 0,123, средние генетические расстояния Жаккарда ($D_{j_{cp}}$) между растениями в пределах популяции – 54,9–61,9 %, в среднем – 58,4 %. Основные показатели генетического полиморфизма популяций – индекс Шеннона (S), несмещенное генное разнообразие Нея (ожидаемая гетерозиготность H_e) были достоверно выше в популяции «Мигия», у остальных популяций их значения были близки. Значение среднего генетического расстояния Жаккарда между растениями в популяциях Коларово и Балаклава было несколько ниже (около 55 %) по сравнению с остальными популяциями (60 %). Для суммарной выборки образцов показатели генетического полиморфизма были выше, чем для отдельных популяций (доля полиморфных ампликонов, среднее генетическое расстояние Жаккарда между растениями и индекс Шеннона), или приближались к наибольшему значению (несмещенное генное разнообразие Нея) (табл. 1).

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что на межпопуляционные различия приходится 24 %, а на внутривидовый полиморфизм – 76% общей генетической гетерогенности. Коэффициент корреляции между матрицами генетических расстояний Нея и географических расстояний между популяциями составил 0,900 ($p = 0,01$), что указывает на положительную связь между этими показателями.

Таблица 1

Значения основных показателей генетического полиморфизма популяций *I. pumila* по данным ISSR-анализа

Популяция	Численность популяции, особей	Доля полиморфных ампликонов (P), %	Ожидаемая гетерозиготность (H_e)	Индекс Шеннона (S)	Среднее генетическое расстояние между растениями по Жаккарду ($D_{j_{ав}}$), %
Мигия	более 1000	56,31	0,150 ± 0,011	0,230 ± 0,016	61,85
Аляуды	около 50	46,85	0,125 ± 0,011	0,190 ± 0,016	59,84
Коларово	до 100	44,59	0,116 ± 0,011*	0,178 ± 0,015*	54,95
Андреевка	до 100	42,79	0,111 ± 0,011*	0,171 ± 0,015*	60,01
Балаклава	до 200	39,64	0,115 ± 0,011*	0,171 ± 0,016*	55,25
В среднем	–	46,04 ± 2,83	0,123 ± 0,005	0,188 ± 0,007	58,38
Суммарная выборка растений	–	97,75	0,152 ± 0,009	0,261 ± 0,012	68,49

Примечание: * – достоверные отличия от популяции Мигия ($p < 0,05$).

Результаты анализа генетического разнообразия *G. lutea*

В результате ПЦР-анализа 86 генотипов *G. lutea* из 6 популяций с использованием 40 праймеров разного типа (RAPD, ISSR, RGAP, CDDP, IRAP) было получено 725 ампликонов, 97 % которых были полиморфными. Показатели генетического полиморфизма популяций *G. lutea*, рассчитанные на основании данных ПЦР-анализа, имели такие значения: доля полиморфных ампликонов – от 29,1 % до 37,9 %; ожидаемая гетерозиготность – от 0,089 до 0,126; индекс Шеннона – от 0,137 до 0,190. Средняя величина генетических дистанций Жаккарда между растениями из природных популяций колебалась от 14,7 % до 56,4 %, а для суммарной выборки растений равнялась 58,7 %. Отдельные популяции отличались между собой по уровню генетического разнообразия. При этом, показатели генетического полиморфизма (P, He, S) у популяций с хр. Черногора были выше по сравнению с популяциями с хр. Свидовец, а у агропопуляции с г. Пожижевская они оказались самыми низкими (табл. 2). По величине средних значений генетических дистанций Жаккарда популяции *G. lutea* расположились следующим образом HT > Lem > Sh > Kr ≈ Tr > Pozh.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) обнаружил значительную дифференциацию популяций *G. lutea*: почти две трети (62 %) генетического разнообразия вида приходится на межпопуляционные различия, а доля внутривидовой дисперсии составляет 38 %. Анализ взаимосвязи генетических и географических расстояний между изученными популяциями показал отсутствие корреляции между этими

показателями. Возможно, это обусловлено крайне ограниченным обменом генетической информацией и значительной дивергенцией популяций после фрагментации ареала в прошлом.

Обобщение полученных результатов

Представленные данные позволяют сравнить последствия фрагментации ареала для генетического разнообразия двух редких видов растений *I. pumila* и *G. lutea*. Рассмотренные виды имеют ряд общих черт. Оба принадлежат к многолетним травянистым корневищным растениям с перекрестным типом опыления. Способны как к семенному, так и вегетативному размножению, хотя если у горечавки семена мелкие и ширококрылатые, и могут разноситься ветром, то крупные круглые семена ириса обычно попадают в почву рядом с родительским растением и переносятся на большое расстояние только случайным образом [10, 13–15].

Вместе с тем, анализ полученных результатов обнаруживает ряд особенностей распределения генетического разнообразия у этих видов. У обоих видов не выявлено выраженной связи между уровнем генетического разнообразия и размером популяций. Изученные популяции *I. pumila* характеризуются близкими значениями показателей генетического разнообразия, из их числа более высокими показателями выделяется только популяция Мигия, имеющая наибольшую численность (более 1000 особей) и площадь. В то же время, даже небольшие по размеру (Аляуды, до 50 особей) или расположенные на краю ареала популяции (Балаклава и Андреевка, 100–200 особей) пока еще сохраняют достаточно высокий уровень генетического разнообразия. У *G. lutea*

Таблица 2

Значения основных показателей генетического полиморфизма исследованных популяций *G. lutea*

Популяция	Численность популяции, особей	Доля полиморфных ампликонов (P), %	Ожидаемая гетерозиготность (He)	Индекс Шеннона (S)	Среднее генетическое расстояние между растениями по Жаккарду (D_{jav}), %
Lem	более 10000	37,9	0,126 ± 0,007	0,190 ± 0,010	30,6
HT	до 100	35,3	0,118 ± 0,007	0,178 ± 0,010	38,7
Sh	более 10000	34,2	0,123 ± 0,007	0,183 ± 0,010	28,1
Kr	до 1000	29,1	0,097 ± 0,006*	0,146 ± 0,009*	27,5
Tr	до 1000	30,2	0,089 ± 0,006*	0,137 ± 0,009*	26,9
Pozh	до 1000	27,7	0,085 ± 0,006*	0,131 ± 0,009*	22,1
Среднее	–	32,4	0,106 ± 0,003	0,161 ± 0,004	29,0
Суммарная выборка растений	–	97,0	0,239 ± 0,006	0,379 ± 0,008	58,7

Примечание: * – достоверные отличия от популяций Lem, HT и Sh ($p < 0,05$).

также не выявлено отличий между популяциями по уровню генетического разнообразия, которые можно было бы напрямую связать с размером популяции, тем не менее, обнаружены отличия между группами популяций, расположенными на двух разных горных массивах. Мы предполагаем, что большую роль для сохранения генетического разнообразия внутри популяций при сокращении численности играет значительная продолжительность онтогенеза, которая может составлять от нескольких десятков у *I. pumila* до ста лет в случае *G. lutea*. Такая особенность биологии, по-видимому, позволяет популяциям двух исследованных нами видов поддерживать генетическую гетерогенность в течение некоторого времени после фрагментации ареала и сокращения численности.

Изученные виды имеют близкие значения основных показателей суммарного генетического разнообразия, они даже несколько выше для *G. lutea*. Однако, если у *I. pumila* на внутривидовой полиморфизм приходится основная часть суммарной генетической гетерогенности (76 %), то у *G. lutea* этот показатель значительно меньше (38 %). В отличие от *I. pumila*, у *G. lutea* не удалось обнаружить корреляции между генетическими и физическими дистанциями между отдельными популяциями. Чем же можно объяснить такие отличия в последствиях фрагментации ареала для двух видов?

I. pumila – типичный степной вид, который, по-видимому, населял обширные территории в степной части Украины до начала масштабной распашки целинных степей, происходившей на протяжении двух последних столетий. Наличие единого ареала в равнинной местности еще в недавнем прошлом способствовало свободному обмену генетическим материалом между разными его частями, а время, прошедшее с момента начала фрагментации ареала, было явно недостаточным для значительной дивергенции популяций. Кроме того, такой обмен, хотя и в меньшей степени, может происходить и в наше время, поскольку популяции *I. pumila* в большинстве своем расположены по верхней части склонов балок и речных долин, непригодных для земледелия и потому сохранивших, пусть и в ограниченном объеме, исходные экосистемы.

Местообитание *G. lutea* – альпийские и субальпийские луга. Естественная рассеченность горного рельефа, сформированного десятки и сотни тысяч лет назад, обуславливает изоляцию популяций, расположенных на разных горных мас-

сивах. Селективное воздействие локальных условий в сочетании с дрейфом генов в небольших изолированных популяциях должны были привести за длительный период времени к выраженной дивергенции популяций, о чем и свидетельствуют результаты анализа распределения генетического разнообразия вида (AMOVA). Обнаруженные отличия между популяциями с разных хребтов трудно объяснить разницей в численности популяций, поскольку среди популяций с хр. Черногора и наибольшая по численности карпатская популяция с г. Шешул-Павлик и одна из малочисленных популяций с г. Гутин Томнатик. Возможными причинами этих отличий могут быть особенности истории формирования популяций, экологических условий и режима использования территорий, где они расположены. В частности, популяции с хр. Свидовец произрастают в менее благоприятных условиях на крутых каменистых склонах, частично заросших ольхой, и подвергаются более интенсивному выпасу. Здесь вегетативное размножение преобладает над генеративным. Популяции с хр. Черногора, расположенные на г. Шешул Павлик, пол. Лемская, имеют большую площадь и плотность растений, и характеризуются достаточно активным генеративным возобновлением [10]. Что касается популяции на г. Гутин-Томнатик, имеющей незначительную площадь и малую численность, ее сравнительно высокий уровень генетического полиморфизма, вероятно, объясняется близостью с популяцией пол. Лемская. Возможно также, что в прошлом эти популяции составляли единое целое, поскольку по результатам Байесовского анализа с использованием программы Structure они формировали единый кластер [9].

Таким образом, наиболее существенными факторами, определяющими обнаруженные отличия в характере распределения генетического разнообразия у двух видов со сходной биологией, является время, прошедшее с момента фрагментации ареала и сокращения численности, и особенности локальных условий, которые вместе определяют глубину и направленность дивергенции популяций, а также степень изменения внутривидового полиморфизма. Свой вклад могут вносить также особенности ландшафтов, разделяющих остаточные популяции, благодаря способности поддерживать обмен генетическим материалом между ними. Для подтверждения обнаруженных закономерностей необходимы дальнейшие исследования на более обширном материале, в том числе и на других видах растений.

Выводы

При интерпретации результатов оценки генетического разнообразия редких видов растений следует принимать во внимание особенности биологии вида и историю формирования популяций. У многолетних растений негативные последствия фрагментации ареала и сокращения численности могут в течение некоторого времени оставаться незаметными. Сокращение численности в условиях изоляции в течение длительного периода времени ведет к неуклонному снижению внутривидовой изменчивости и росту дивергенции популяций.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Целевой междисциплинарной программы научных исследований НАН Украины «Фундаментальные основы молекулярных и клеточных биотехнологий» в рамках проекта «Порівняльна геноміка у діагностиці генотипу деяких рідкісних видів рослин України», а также Министерства образования и науки Украины в рамках проекта «Оцінка еколого-генетичного потенціалу рідкісних видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) в Українських Карпатах».

ЛИТЕРАТУРА

1. Saunders D.A., Hobbs R.J., Margules C.R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review // *Conserv. Biol.* – 1991. – 5. – P. 18–32.
2. Hobbs R.J., Yates C.J. Impacts of ecosystem fragmentation on plant populations: generalising the idiosyncratic // *Austral. J. Bot.* – 2003. – 51. – P. 471–488.
3. Klank C., Ghazoul J., Pluess A.R. Genetic variation and plant performance in fragmented populations of globeflowers (*Trollius europaeus*) within agricultural landscapes // *Conserv. Genet.* – 2012. – 13, N 3. – P. 873–884.
4. Aguilar R., Quesada M., Ashworth L., Herrerias-Diego Y., Lobo J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches // *Mol. Ecol.* – 2008. – 17, N 24. – P. 5177–5188.
5. Ewers R.M., Didham R.K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation // *Biol. Rev.* – 2006. – 81. – P. 117–142.
6. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я.П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
7. Бублик О.М., Андреев И.О., Парнікоза І.Ю., Троїцька Т.Б., Кунах В.А. Комплексна оцінка стану популяцій *Iris pumila* L. України // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2013. – 13. – С. 18–22.
8. Парнікоза І.Ю., Бублик О.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В., Голембевська Й., Кубяк М., Кучинська А., Мистковська К., Оленджицька Н., Урасінська Б., Гурняк М., Сьлензак-Парнікоза А., Войцеховський К., Дідух Я.П., Кунах В.А. Комплексна оцінка стану популяцій степових багаторічників України на прикладі *Iris pumila* // *Укр. бот. журнал.* – 2014. – 71, № 4. – С. 471–480.
9. Мосула М.З., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Дробик Н.М., Андреев И.О., Кунах В.А. Генетична структура і диференціація популяцій *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) в Українських Карпатах // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2014. – 12, № 2. – С. 174–183.
10. Майорова О.Ю., Грицак Л.Р., Терехова Г.І., Мельник В.М., Дробик Н.М. *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) у флорі Українських Карпат: характеристика та сучасний стан популяцій // *Укр. ботан. журн.* – 2013. – 70, № 5. – С. 780–787.
11. Rogers I., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biology.* – 1985. – 5, N 2. – P. 69–76.
12. Mosula M.Z., Andreev I.O., Bubyk O.M., Melnyk M., Konvalyuk I.I., Droblyk N.M., Kunakh V.A. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians // *Plant Genetic Resources.* – 2014. Doi:10.1017/S147926211400104X.
13. Сикура И.И., Шиша Е.Н. Genus *Iris* L. (Iridaceae) – род Касатик, Ирис (Касатиковые). – К.: Знання України, 2010. – 195 с.
14. Структура популяцій рідкісних видів флори Карпат / Під ред. К.А. Малиновського. – К.: Наук. думка, 1998. – 176 с.
15. Бедей М.І., Кризь О.П., Волощук М.І., Маханець І.А. Тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.) в Українських Карпатах. – Ужгород, 2010. – 134 с.

ANDREEV I.O.¹, BUBLYK O.M.¹, MOSULA M.Z.², SPIRIDONOVA K.V.¹, DROBYK N.M.², KUNAKH V.A.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademyka Zabolotnogo str., 150, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,
Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonis str., 2, e-mail: n.drobyk@gmail.com.

IMPACT OF HABITAT FRAGMENTATION ON GENETIC DIVERSITY OF PLANTS IN TWO RARE SPECIES OF THE UKRAINIAN FLORA *GENTIANA LUTEA* L. AND *IRIS PUMILA* L.

Aims. The paper summarizes the results of population genetic studies of two rare species of the Ukrainian flora in order to identify factors that may affect the changes in the genetic diversity of populations caused by the reduction in the size and habitat fragmentation. **Methods.** Molecular genetic analysis using various types of dominant PCR markers, statistical methods for genetic data analysis. **Results.** It was found that, in perennials, genetic effects of habitat fragmentation and reduction in population size may remain indiscernible for some time. Reduced size in conditions of long-term isolation leads to a steady decline in intra-population variation and increasing divergence of the populations. **Conclusion.** When interpreting the results of the evaluation of the genetic diversity of rare plant species, it is important to consider life-history traits of the species and the history of populations.

Keywords: genetic diversity, habitat fragmentation, rare species.