

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тульский государственный университет»

ISSN 2071-6176

ИЗВЕСТИЯ
ТУЛЬСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
УНИВЕРСИТЕТА

Естественные науки

Выпуск 2

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТулГУ
ТУЛА 2011

Известия ТулГУ. **Естественные науки.** Вып. 2. — Тула: Изд-во ТулГУ, 2011. — 384 с.

В выпуске опубликованы оригинальные статьи по актуальным проблемам математики, механики, информатики, физики, химии, биологии.

Материалы предназначены для научных работников, преподавателей вузов, студентов и аспирантов, специализирующихся в области естественных наук.

Редакционный совет

М.В. Грязев — председатель, В.Д. Кухарь — зам. председателя, А.А. Маликов — отв. секретарь, В.В. Прейс — главный редактор, В.А. Алфёров, И.А. Батанина, О.И. Борискин, В.И. Иванов, В.С. Карпов, Н.М. Качурин, Р.А. Ковалев, А.К. Талалаев, Е.А. Федорова, А.Н. Чуков.

Редакционная коллегия

В.И. Иванов — отв. редактор, В.А. Алфёров, И.М. Буркин, Н.М. Добровольский, Д.М. Левин, А.А. Маркин, Е.Н. Музафаров, Л.А. Толоконников, Н.Н. Фотиева, А.В. Иванов — отв. секретарь.

Подписной индекс 27845
по Объединенному каталогу «Пресса России»

«Известия ТулГУ» входят в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук

© Авторы научных статей, 2011

© Издательство ТулГУ, 2011

УДК 575.22; 502.4

Анализ динамики генетической структуры популяций жука-оленья (*Lucanus cervus* L.) на основе аллозимной изменчивости и RAPD-маркеров *

Э. А. Снегин

Аннотация. На протяжении пяти лет с использованием метода электрофореза белков в полиакриламидном геле и метода RAPD-PCR проводился анализ генетической структуры популяции жука-оленья (*Lucanus cervus* L., 1758) окрестностей г. Белгород. Отмечен высокий уровень гетерозиготности и другие показатели генетической изменчивости в изучаемой популяции. Выдвигается гипотеза о переносе генетической информации между генерациями разных лет.

Ключевые слова: особо охраняемый вид, популяционные генофонды, временная динамика.

Введение

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.

Одним из таких видов является жук-олень (*Lucanus cervus* L., 1758), который занесен в Красную Книгу Российской Федерации, а также в приложение 3 Бернской конвенции [1]. Основным ограничивающим фактором для вида являются лесотехнические мероприятия, сопровождающиеся вырубкой дубрав, удалением старых деревьев и выкорчевыванием пней.

Стоит отметить, что вид имеет пятилетний цикл развития. Личинки в течение четырех лет развиваются в подземной части стволов и толстых

* Работа выполнена при финансовой поддержке программы РНПВШ № 2.2.3.1/ 9731, РФФИ № 09-04-97513 р_центр_а., Министерства образования и науки РФ ГК П 1050.

корнях старых деревьев, питаюсь древесиной. Окукливание происходит на четвертый год в сентябре. Имаго зимует в земле [2]. Выход для размножения в районе исследования осуществляется в мае-июле (редко в августе). Самцы после спаривания, а самки после откладки яиц погибают. Таким образом, генерации разных лет репродуктивно изолированы друг от друга, и представляют собой отдельные менделеевские субпопуляции. Выяснение особенностей генетических процессов, происходящих в таких генерациях, во многом может дать представление о перспективах выживания этого вида.

Цель работы. На основе биохимических маркеров оценить временные изменения генетической структуры популяции жука-оленья окрестностей г. Белгорода, расположенном на юге лесостепи Среднерусской возвышенности.

Материал и методика

Сбор жуков происходил с 2006 по 2010 годы в двух смежных широколиственных лесных массивах, располагающихся в окрестностях г. Белгород (дубрава возле завода «Сокол» — $50^{\circ}38'31.41''$ с.ш., $36^{\circ}32'56.80''$ в.д. и смешанный лес в урочище «Меловая гора» — $50^{\circ}37'17.68''$ с.ш., $36^{\circ}36'20.77''$ в.д.). Для получения репрезентативной картины данные по двум пунктам были объединены.

Ввиду того, что исследуемый вид сокращает свою численность и является охраняемым, мы осуществляли ограниченные выборки особей из популяций, составляющих не более 10 % от общей численности. Большинство собранных экземпляров хранится в криобанке лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии БелГУ.

У жука-оленья нами был диагностирован локус неспецифических эстераз *LCEst3* с двумя аллелями, наследуемых по кодоминантному типу* (рис. 1). Экстракцию ферментов проводили из грудных мышц насекомого, путем замораживания при -80°C с последующим оттаиванием и механическим измельчением тефлоновым гомогенизатором в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 6,7). Электрофорез изоферментов проводился в 10 % полиакриламидном геле в камере VE-3 («Helicon»). Гелевый трис-НСI-буфер (концентрирующий гель рН 6,7, разделяющий гель рН 8,9); электродный трис-глициновый-буфер (рН 8,3). Окрашивание блоков проводилось в субстратной смеси: трис-НСI (рН 7,4), α -нафтилацетат, прочный красный TR.

Исследование генома на основе ДНК-маркеров (метод *RAPD-PCR*). На первоначальном этапе был проведен скрининг по 17 случайным праймерам. Из них были выбраны два праймера, дающие наиболее хорошо выделяющиеся и воспроизводимые фингерпринты — *OPF 12* (5-TGTCATCCCC-3) и *OPF 5* (5-CCGAATTCCC-3; рис. 2). *RAPD-PCR*

* Всего у *L. cervinus* нами выявлено три локуса эстераз. Локус *LCEst3* расположен в центральной зоне электрофореграммы и четко обособлен от остальных локусов (локус *LCEst1* — мономорфен, локус *LCEst2* — имеет слабую активность и проявляется не у всех особей).

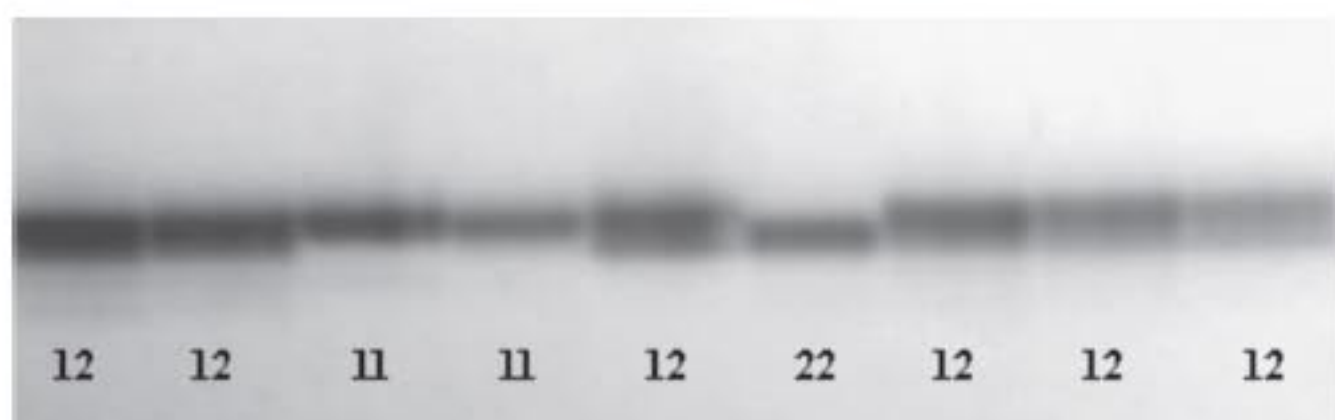


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы локуса *LCEst3* (цифрами обозначены комбинации аллелей)

выполняли в соответствии с правилами его постановки. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, 100 мМ трис-НСl (рН 8,3), 500 мМ КСL, 2 мМ MgCl, 0,25 dNTP, 0,5 мМ праймера, 0,5 единиц Taq ДНК полимеразы. Реакция проходила в следующих условиях: «горячий старт» — 2 мин/94°C, 45 циклов (денатурация — 45 с/94°C, отжиг праймера — 30 с/30°C, 15 с/45°C, синтез — 2 мин/72°C), дополнительный синтез — 10 мин/72°C, охлаждение до 4°C. Продукт ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием TAE буфера. Блоки окрашивали бромистым этидием.

По картинам электрофореза составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1», отсутствие «0». Для каждого праймера было выделено по 16 продуктов амплификации. Ввиду того, что при методе *RAPD* могут появляться неспецифические продукты амплификации, для анализа мы использовали четко просматриваемые и воспроизводимые ампликоны.

Обработка полученных данных проводилась с использованием программы GenAlEx [3].

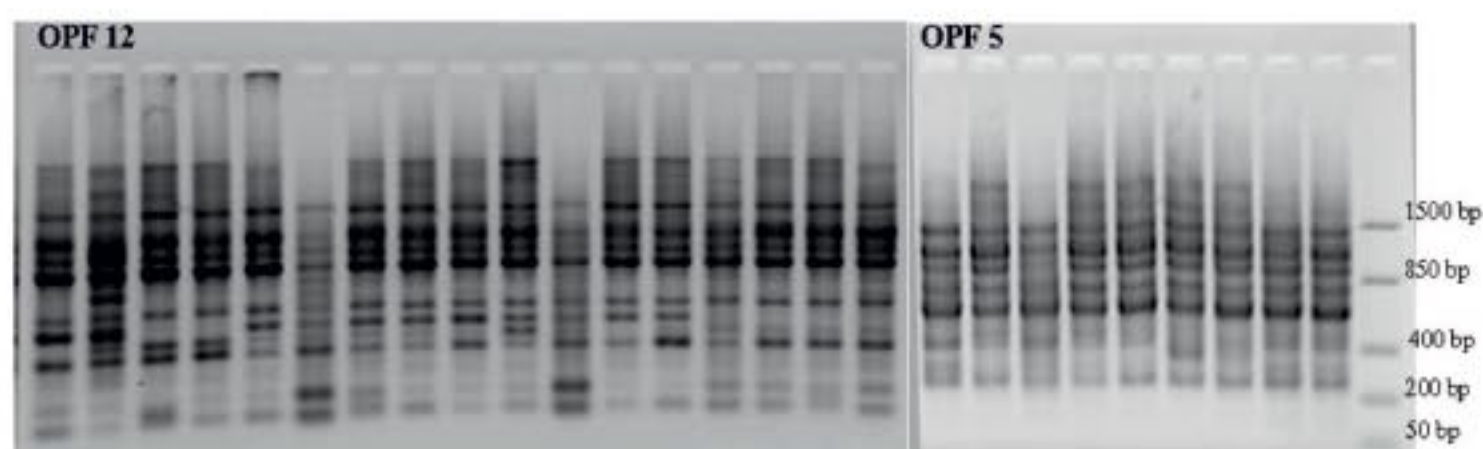


Рис. 2. *RAPD-PCR* спектры ДНК *L. cervus* при использовании праймеров OPF 12 и OPF 5

1. Полученные результаты и обсуждение

Динамика частот аллелей в локусе *LCEst3* отражена на рис. 3. Для сопоставления этих данных, полученных в разные годы, нами был применен точный критерий Фишера (Fisher Exact Test) [4]. Результат показал отсутствие достоверных отличий между различными генерациями, т. е. что во всех случаях подтверждается нуль-гипотеза о пропорциональности аллельных частот в различные годы (при 5 % уровне значимости).

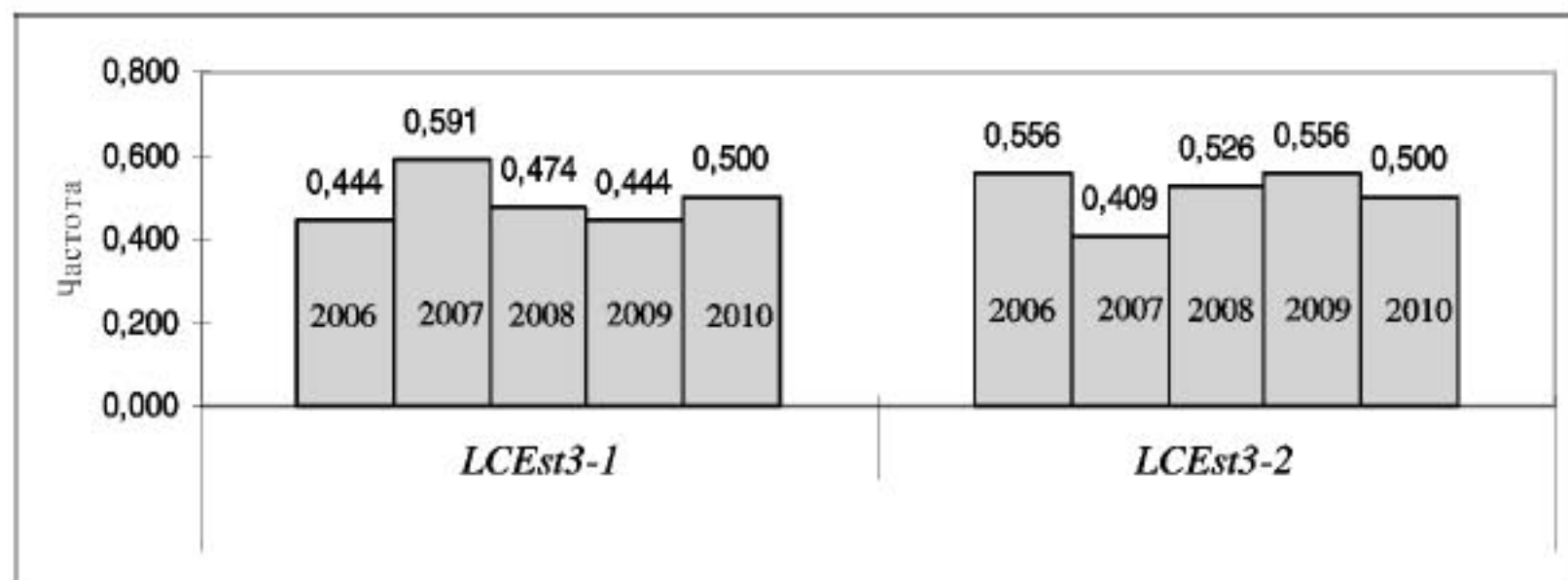


Рис. 3. Частоты аллелей локуса *LCEst3* в репродуктивных группах *L. cervus* разных лет (объем выборок приведен в таблице 1)

Отсутствие достоверной оригинальности между группами разных генераций по локусу *LCEst3* подтверждается так же сходными показателями уровня генетической изменчивости (табл. 1)*.

ТАБЛИЦА 1

Показатели генетической изменчивости в исследуемых группах *L. cervus*, вычисленные с использованием локуса *LCEst3*

Год	<i>N</i>	χ^2	<i>A_e</i>	<i>I</i>	μ	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>
2006	36	6,891	1,976	0,687	1,99	0,278	0,494	0,438
2007	33	1,202	1,936	0,677	1,98	0,576	0,483	-0,191
2008	38	5,265	1,994	0,692	2,00	0,684	0,499	-0,372
2009	45	0,288	1,976	0,687	1,99	0,533	0,494	-0,080
2010	19	2,579	2,000	0,693	2,00	0,684	0,500	-0,368

Примечание: *N* — объем выборки, *A_e* — эффективное число аллелей; *I* — индекс Шеннона; *H_o* — средняя наблюдаемая гетерозиготность; *H_e* — средняя ожидаемая гетерозиготность; *F* — коэффициент инбридинга; μ — среднее число фенотипов (значение μ приведено по Л.А. Животовскому [5]).

* Высокий уровень коэффициента инбридинга в 2006 году, вероятно, вызван неравномерностью выборки.

Использование F -статистики Райта (табл. 2) показало, что коэффициенты F_{is} и F_{it} имеют отрицательное значение, а коэффициент F_{st} , отражающий пространственную дифференциацию популяций, незначителен.

Об отсутствии дивергенции по частотам аллелей между разногодичными репродуктивными группами говорит так же довольно высокая средняя оценка потока генов между ними (Nm).

Результаты, полученные на основе анализа локуса эстеразы, во многом подтверждаются данными, полученными с использованием метода *RAPD-PCR*.

ТАБЛИЦА 2

Значения средней гетерозиготности, среднего потока генов и коэффициентов инбридинга в изучаемых группах *L. cervus*

F_{is}	F_{it}	F_{st}	Nm	H_o	H_e
-0,116	-0,102	0,012	21,0	0,551	0,494

Примечание: F_{it} — коэффициент инбридинга особи относительно большей популяции; F_{is} — коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции; F_{st} — коэффициент инбридинга субпопуляции относительно большей популяции; Nm — средняя оценка потока генов между популяциями.

Частоты проявления ампликонов на электрофоретических спектрах приведены в табл. 3. Данные показывают, что по отдельным сайтам амплификации отмечается годовая динамика, тем не менее по средним показателям генетической изменчивости мы наблюдаем сходную картину (табл. 4). Причем уровень изменчивости оказался несколько ниже, чем по локусу эстераз. Стоит отметить так же, что некоторые фрагменты ДНК стабильно амплифицируются у всех или у большинства особей (например, *OPF 5-9*, *OPF 12-7*). Вероятно, эти последовательности являются либо видоспецифичными, либо специфичными для данной популяции.

Значения индекса генетического сходства по Ней [6] приведены в табл. 5. Результаты показывают значительное сходство между репродуктивными группами разных лет как в отношении частот локуса *LCEst3*, так и по спектрам *RAPD-PCR*.

Исходя из приведенных данных, можно сделать следующие выводы.

Во-первых, высокие значения уровня гетерозиготности, индекса Шеннона, эффективного числа аллелей и низкие показатели коэффициента инбридинга в изучаемых репродуктивных группах *L. cervus* разных лет подтверждают выдвинутый нами ранее тезис [7], о том, что популяции жука-оленья в районе исследования находятся в удовлетворительном состоянии.

Во-вторых, отмеченные по *RAPD*-маркерам несколько меньшие показатели генетической изменчивости, чем по локусу *LCEst3*, обусловлены тем, что полученные фингерпринты, отражающие состояние генома в целом, получены в результате амплификации анонимных участков ДНК,

ТАБЛИЦА 3

Частота проявления продуктов амплификации в изучаемых группах *L. cervus*, полученных с использованием метода *RAPD-PCR* (праймеры *OPF 5* и *OPF 12*)

Год	Номер ампликона (праймер <i>OPF 5</i>)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2006	0,457	0,286	0,200	0,771	0,057	0,971	0,971	0,971
2007	0,412	0,412	0,588	1,000	0,235	1,000	1,000	1,000
2008	0,159	0,159	0,455	0,773	0,227	0,932	0,773	0,932
2009	0,978	0,111	0,978	1,000	0,711	1,000	1,000	1,000
2010	0,000	0,000	0,154	0,462	0,077	0,692	0,692	0,462
	9	10	11	12	13	14	15	16
2006	1,000	0,400	0,657	0,400	0,914	0,886	0,057	0,829
2007	1,000	0,059	1,000	0,000	0,706	0,765	0,412	0,353
2008	1,000	0,273	0,977	0,114	0,955	0,932	0,182	0,114
2009	1,000	0,333	0,911	0,244	0,667	0,867	0,022	0,156
2010	1,000	0,538	1,000	0,077	0,308	0,769	0,000	0,077
Год	Номер ампликона (праймер <i>OPF 12</i>)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2006	0,057	0,914	0,114	0,057	0,971	0,971	1,000	0,000
2007	0,471	0,941	0,000	0,118	0,824	0,824	0,882	0,118
2008	0,136	0,773	0,295	0,045	0,955	0,523	1,000	0,023
2009	0,933	1,000	0,133	0,133	0,978	0,978	1,000	0,089
2010	0,077	0,923	0,077	0,231	0,615	0,462	0,846	0,000
	9	10	11	12	13	14	15	16
2006	0,057	0,886	0,457	0,543	0,971	0,629	0,657	0,971
2007	0,118	0,765	0,588	0,765	0,824	0,412	0,412	1,000
2008	0,045	0,909	0,318	0,273	0,932	0,068	0,977	0,864
2009	0,067	1,000	0,667	0,667	1,000	0,644	0,822	1,000
2010	0,077	0,692	0,462	0,846	0,846	0,308	0,769	0,538

включая полиморфные и мономорфные локусы, что, вероятно, находит свое отражение в снижении среднего уровня изменчивости.

В-третьих, отсутствие достоверных отличий по аллельным частотам локуса *LCEst3* между репродуктивно изолированными группами *L. cervus* можно расценивать как результат сходных векторов естественного отбора в изучаемом биотопе в разные годы.

В-четвертых, небольшая генетическая дистанция между репродуктивно изолированными группами *L. cervus*, отмеченная как локуса *LCEst3*, так и по *RAPD*-спектрам, которые отражают в большей мере генетико-автоматические процессы, свидетельствуют о том, что между

ТАБЛИЦА 4

Показатели генетической изменчивости, выявленные методом *RAPD-PCR* (*P* — процент полиморфных локусов, остальные обозначения как в табл. 1)

Год	<i>N</i>	<i>P</i> %	<i>Ae</i>	<i>I</i>	<i>He</i>
2006	35	90.62	1,457	0,424	0,277
2007	17	71.88	1,455	0,384	0,260
2008	44	93.75	1,408	0,401	0,256
2009	45	68.75	1,337	0,308	0,201
2010	13	81.25	1,470	0,401	0,268

ТАБЛИЦА 5

Значения индекса генетического сходства между изучаемыми группами *L. cervus*

По <i>LCEst3</i>						По <i>RAPD</i>				
2006	2007	2008	2009	2010	Годы	2006	2007	2008	2009	2010
1,000					2006	1,000				
0,958	1,000				2007	0,937	1,000			
0,998	0,973	1,000			2008	0,930	0,931	1,000		
1,000	0,958	0,998	1,000		2009	0,889	0,932	0,883	1,000	
0,994	0,984	0,999	0,994	1,000	2010	0,881	0,885	0,919	0,812	1,000

репродуктивными группами *L. cervus* разных лет, вероятно, существует ограниченный перенос генетической информации. По нашим наблюдениям небольшая часть особей в стадии имаго выходят на поверхность в августе, т.е. когда репродуктивный период уже закончился. Нельзя исключать, что это могут быть четырехлетние жуки, которые в результате благоприятного стечения факторов (оптимальная температура, обильный корм и т.д.) прошли более ускоренный вариант развития. Их потомки, пройдя полный пятилетний онтогенез, могут привести к сдвигу временной рамки, размножаясь уже в другой репродуктивной группе. Таким образом, вероятно, может осуществляться перенос генов между разногодичными репродуктивными группами и тем самым поддерживаться генетическое единство популяции и вида.

Стоит отметить, что последний вывод требует определенной доли осторожности, и диктует необходимость более тщательного изучения биологии жука-оленья.

Список литературы

1. Красная книга Российской Федерации (животные). М.: АСТ Астрель, 2001. 863 с.

2. Burakowski B., Mroczkowski M., Stefanska J. Chrzaszczce – Coleoptera: Scarabaeoidea, Dascilloidea, Byrrhoidea I Parnoidea / Katalog fauny Polski. Warszawa: Panstwowe wydawnictwo naukowe. 1983. Czesc. XXIII. T.9. 294 s.
3. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reseach. Canberra: Australian National University, 2001. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.
4. Фишер Р.А. Статистические методы для исследователей. М.: Госстатиздат, 1958. 268 с.
5. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
6. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numba of individuals // Genetics. 1978. V.89. P.583–590.
7. Анисимова К.С., Снегин Э.А. Морфогенетические параметры популяций жука-олени (*Lucanus cervus* L.) в условиях лесостепи Среднерусской возвышенности. Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики. Белгород: ИПЦ Политерра, 2010. С.15.

Снегин Эдуард Анатольевич (snegin@bsu.edu.ru), к.б.н., доцент, зав. научно-исследовательской лабораторией, лаборатория популяционной генетики и генотоксикологии, Белгородский государственный университет.

Analysis of the dynamics of the genetic structure of populations of stag beetle (*Lucanus cervus* L.) based on allozyme variability and *RAPD*-markers

E. A. Snegin

Abstract. For five years, using the electrophoresis of proteins in polyacrylamide gel and the method of *RAPD-PCR* analysis was performed of the genetic structure of populations of stag beetle (*Lucanus cervus* L., 1758) neighborhoods of Belgorod. A high level of heterozygosity, and other indicators of genetic variability in the studied population. A hypothesis about transfer of genetic information between generations in different years.

Keywords: specially protected species, population gene pools, temporal dynamics.

Snegin Edward (snegin@bsu.edu.ru), candidate of biological sciences, associate professor, head of the research laboratory, laboratory of population genetics and genetoksikologi, Belgorod State University.

Поступила 07.06.2011