

## АЛЛОЗИМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО *QUERCUS ROBUR* L. (FAGACEAE) В ИЗОЛИРОВАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ НА ВОСТОЧНОЙ ГРАНИЦЕ АРЕАЛА

С использованием изоферментных маркеров 17 локусов на территории Башкирского Зауралья исследована генетическая структура двух изолированных популяций дуба черешчатого, находящихся на крайней восточной границе ареала в экстремальных для вида экологических условиях. Выявлена уникальность их генофонда и относительно слабая межвыборочная подразделенность.

В последние два десятилетия значительная часть экологических исследований посвящена изучению генетического разнообразия редких и исчезающих растений. Основанием для этого служат значительные антропогенные изменения среды обитания живых организмов, к которым особенно чувствительна эта категория [3, с. 12]. Видам, для которых угроза генофонду существует на популяционном уровне (для отдельных популяций), уделяется меньше внимания. Однако некоторые из них, особенно находящиеся вне зоны экологического оптимума, требуют охраны из-за адаптации к местным условиям среды и уникальности генофонда. По ряду причин в этом отношении представляет интерес изучение генетической структуры популяций дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) на восточной части ареала.

Цель данного сообщения – оценка генетической изменчивости и дифференциации двух популяций дуба черешчатого из Башкирского Зауралья (Баймакский район Башкортостана). Они изолированы от дубняков западного макросклона Южно-Уральских гор и Башкирского Предуралья полосой сосново-березовых и березовых лесов шириной более 100 км, протянутой с севера на юг по всему Южному Уралу. Насаждения представляют пример жесткой репродуктивной изоляции в условиях практически полного отсутствия генетического потока извне. Популяция, условно обозначенная нами Ark, насчитывает всего 7 особей репродуктивного возраста. Она находится в условиях горной степи на вершине холма. Другое насаждение (Kus) расположено северо-западнее на расстоянии около 20 км в условиях горной лесостепи, и дуб здесь входит в состав березового древостоя как при-

месь. Всего нами обнаружено 20 деревьев в возрасте плодоношения.

Для лабораторных анализов с каждого дерева в зимнее время было срезано по одной ветке и помещено в воду при комнатной температуре. Изоферменты из начавших распускаться почек были использованы для разделения в полиакриламидном диск-электрофорезе в вертикальных пластинах 7,5%-ного геля с pH 8.9. Детальное описание использованных методик электрофоретического анализа и гистохимического окрашивания приведено ранее [2, с. 1566]. Исследована изменчивость следующих ферментов: 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6PGDH, E.C. 1.1.1.44.), шикиматдегидрогеназы (SKDH, E.C. 1.1.1.25), глутаматдегидрогеназы (E.C. 1.4.1.2.), формилдегидрогеназы (FDH, E.C. 1.2.1.2.), аланинаминопептидазы (AAP, E.C. 3.4.11.1.), лейцинаминопептидазы (LAP, E.C. 3.4.11.2.) диафоразы (DIA, E.C. 1.6.4.3.), НАДНдегидрогеназы (NADHDH, E.C. 1.6.99.2.), флуоресцентной эстеразы (FE, E.C. 3.1.1...), малатдегидрогеназы (MDH, E.C. 1.1.1.37.), аспаргатаминотрансферазы (AAT, E.C. 2.6.1.1.), малик-энзима (ME, E.C. 1.1.1.40.).

Для исследования генетического разнообразия и дифференциации популяций применены показатели и процедуры, определяемые компьютерной программой BIOSYS-1 [7, с. 281], – частота аллелей  $r_A$ , доля полиморфных локусов  $P$ , наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность  $H_o$  (и  $H_e$  соответственно), параметры F-статистики Райта  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  и  $F_{st}$ , коэффициент инбридинга  $F$ , генетическое расстояние  $M$ . Нея  $D$ , оценка соответствия наблюдаемых распределений генотипов теоретически ожидаемым частотам по правилу Харди - Вайнберга. Характеристика па-

раметров и использованные для расчетов формулы были приведены ранее [2, с. 1566].

Анализ электрофореграмм показал, что аспаратаминотрансфераза в гелях обнаруживается в виде двух мономорфных зон активности, из них электрофоретически более подвижная область выявляется лишь при длительном инкубировании.

Малатдегидрогеназа окрашивается в виде трех инвариантных зон активности MDH-1, MDH-2, MDH-3.

При окрашивании гелей на выявление диафоразы наблюдаются минимум три зоны активности без изменчивости. Две из них, в ближней к катоду части геля, представляют аллозимы НАДНдегидрогеназы. Они выявляются и при отсутствии субстрата диафоразы при наличии только кофактора НАДН (являющегося субстратом NADHDH). Гистохимически наиболее активная зона контролируется мономорфным локусом Dia-1.

Малик-энзим кодируется одним мономорфным локусом с высокой гистохимической активностью его изофермента.

Частоты аллозимов (изоферментов одного локуса) изменчивых ферментов приведены в табл.

У флуоресцентной эстеразы обнаружены три зоны изоферментов, из которых две ближние к катоду зоны мономорфны. В FE-1 обнаружен слабый полиморфизм, а фермент, по-видимому, димер – у гетерозигот наблюдаются трехполосные спектры.

6-Фосфоглюконатдегидрогеназа выявляется в виде одной зоны активности bPGD-1 с одно- и трехполосными фенотипами у отдельных деревьев, что доказывает димерность фермента у дуба черешчатого. Среди изученных 26 деревьев мы обнаружили 3 аллозима, один из которых доминирует в обеих выборках. В ближней к катоду части геля наблюдалась дополнительная относительно слабая гистохимическая активность, однако надежная интерпретация изменчивости в этой зоне не была возможна.

Шикиматдегидрогеназа также выявлялась в виде двух областей активности, из которых надежной интерпретации поддавалась зона Skdh-1 с большей электрофоретической подвижностью. Мономерность фермента

доказывается наличием двухполосных фенотипов ферментов у гетерозиготных и однополосных – у гомозиготных деревьев. В обоих насаждениях найдены по два аллозима, один из которых доминирует по частоте.

Единственная зона глутаматдегидрогеназы выявляется в виде четких одинарных полос у гомозигот. У гетерозиготных деревьев образуется диффузная зона активности, включающая, видимо, гибридные молекулы. При длительном разделении глутаматдегидрогеназы в диффузной зоне удается различить до 7 полос, как это наблюдается у гексамерных ферментов. Наибольшую частоту имеет первый по электрофоретической подвижности аллозим.

При окрашивании гелей для выявления аланинаминопептидазы наблюдается активность в двух областях. Аллозимы ближайшей к катоду зоны активности одинаково выявляются при использовании субстратов как аланинаминопептидазы, так и лейцинаминопептидазы. Обнаружены два аллозима с сопоставимыми частотами. Электрофоретически более подвижная зона при использовании субстрата лейцинаминопептидазы состоит из множества полос. Спектр представляет собой сумму аллозимов лейцинаминопептидазы и аланинаминопептидазы, причем из-за перекрытия изоферментных полос диагностировать изоферменты не представляется возможным. Если используется субстрат аланинаминопептидазы, в гелях выявляются лишь ее три аллозима. У отдельных гетерозиготных деревьев образуются двухполосные фенотипы Aap-1 и Aap-2, что характерно для мономерных ферментов.

Формиатдегидрогеназа контролируется одним локусом Fdh-1 с 3 аллелями, две из которых являются относительно частыми. Третий редкий аллель встречается лишь в выборке Ark. Фермент у дуба черешчатого является димером – у гетерозиготных деревьев наблюдаются трехполосные фенотипы.

Таким образом, использованная нами методика электрофоретического анализа позволила нам выявить 10 мономорфных локусов и надежно идентифицировать аллозимы 7 полиморфных локусов. Полученные нами данные об особенностях генетической

изменчивости изученных ферментов в целом соответствуют данным по дубу черешчатому из других регионов [3, с. 29-30]. У видов дуба аллозимы формиадегидрогеназы ранее не были исследованы.

Результаты полокусного генетического анализа приведены в табл. В среднем для 17 локусов из выборок Kus и Ark получены следующие величины генетического разнообразия: число аллелей  $A = 1.52 \pm 0.2$  и  $A = 1.47 \pm 0.2$ , доля полиморфных локусов в обоих местообитаниях  $P = 0.412$  и  $P = 0.353$ , ожидаемая гетерозиготность  $H_E = 0.124 \pm 0.051$  и  $H_E = 0.118 \pm 0.046$ , наблюдаемая  $H_O = 0.145 \pm 0.053$  и  $H_O = 0.138 \pm 0.049$  соответственно. Эти оценки ниже, чем сообщается [6, с. 191] для покрытосеменных ( $A = 2.10$ ,  $P = 0.595$ ,  $H_E = 0.183$ ) и коренных ( $A = 2.27$ ,  $P = 0.660$ ,  $H_E = 0.182$ ) видов, растений лесной и лесостепной зон ( $A = 2.58$ ,  $P = 0.825$ ,  $H_E = 0.206$ ), организмов, распространяющих семена с использованием гравитационного механизма ( $A = 2.48$ ,  $P = 0.619$ ,  $H_E = 0.144$ ). Для дуба черешчатого из западного макросклона Южно-Уральских гор, по нашим данным [1, с. 15], показатели генетического разнообразия следующие: ( $A = 3.76$ ,  $P = 0.71$ ,  $H_E = 0.264$ ). В локусах дуба черешчатого в 9 популяциях Южного Урала выявлено большее аллельное разнообразие [1, с. 14]. В частности,

у 6Pgdh-1, Gdh-1 Fdh-1, в отличие от выборок Kus и Ark, обнаружены по 5 аллелей, в Dia-1 – 6, в Aap-2 – 7 и в Aap-1 – 9. Таким образом, сравнительно низкие уровни генетической изменчивости дуба черешчатого в Башкирском Зауралье обусловлены, видимо, особенностями их генетической структуры.

В малых изолированных популяциях, аналогичных изученным нами (крайне малая численность, полная генетическая изоляция), теоретически должны ощущаться последствия воздействия дрейфа генов [2, с. 1569]. Однако выявленный феномен относительно низкой генетической изменчивости, видимо, обусловлен лишь статистическими причинами – небольшие выборки уже благодаря ограниченности объема не могут представлять большую часть генофонда. Дрейф генов стремится к фиксации аллелей – доведению их частот до 0 или 1.000. Но в таких полиморфных локусах, как Aap-1, Aap-2, Gdh-1, Fdh-1 и 6Pgdh-1, альтернативные аллели имеют сопоставимые частоты, локусы характеризуются высокой гетерозиготностью, обнаружены редкие аллели. Кроме того, при воздействии этого микроэволюционного фактора в каждой изолированной малой популяции фиксация происходит для разных аллелей. А выборки Kus и Ark похожи по частоте как доминирующих, так и относительно редких

Таблица. Генетическое разнообразие в изолированных местообитаниях *Quercus robur* L.

Локус	N <sub>A</sub>	r <sub>A</sub>		H <sub>E</sub>		H <sub>O</sub>		F		D	F <sub>ST</sub>		
		Kus	Ark	Kus	Ark	Kus	Ark	Kus	Ark				
Aap-1	1	0.474	0.286	0.625	0.571	0.632	0.571	(+)	0.011	0	0.116	0.036	
	2	0.184	0.143										
	3	0.342	0.574										
Aap-2	1	0.289	0.143	0.411	0.245	0.368	0.286	(+)	0.105	(-)	0.167	0.025	0.032
	2	0.711	0.857										
Gdh-1	1	0.737	0.786	0.388	0.337	0.211	0.143	(+)	0.456	(+)	0.576	0.003	0.003
	2	0.263	0.214										
Fdh-1	1	0.395	0.143	0.478	0.357	0.579	0.429	(-)	0.211	(-)	0.202	0.085	0.057
	2	0	0.071										
	3	0.605	0.786										
Skdh-1	1	0.026	0.214	0.051	0.337	0.053	0.429	(-)	0.040	(-)	0.273	0.029	0.083
	2	0.974	0.786										
6Pgdh-1	1	0.026	0	0.309	0.337	0.211	0.143	(+)	0.317	(+)	0.576	0.003	0.004
	2	0.816	0.786										
	3	0.158	0.214										
Fe-1	1	0.079	0	0.145	0	0.053	0	(+)	0.634	0	0.004	0.041	
	2	0.079	1.000										

Примечания: N<sub>A</sub> и r<sub>A</sub> – номера и частоты аллелей, \* – с учетом мономорфных локусов.

аллелей (табл.). О сходстве генофонда свидетельствуют и небольшая величина генетических расстояний, в том числе их полокусные значения. В среднем  $D = 0.011$  – это уровень, характерный для близко расположенных популяций таких видов, как сосна обыкновенная и ель сибирская [1, с. 18]. Кроме того, в среднем по 7 полиморфным локусам показатель межвыборочной подразделенности  $F_{st} = 0.034$ . Другими словами, из общей изменчивости двух популяций 94.6% представлены внутривыборочной компонентой, а межвыборочная составляющая равна всего 3.4%. Еще одним аргументом в пользу отсутствия воздействия дрейфа генов на генофонд двух изученных популяций является то, что состав генотипов сбалансирован и статистически достоверно не отличается от распределения, ожидаемого по правилу Харди - Вайнберга. В то же время нельзя исключить, что в следующих поколениях популяций дрейф генов будет формировать генетическую структуру в качестве ведущего микроэволюционного фактора.

В малых изолированных популяциях теоретически должно ощущаться влияние и другого фактора – инбридинга. Однако наши данные не позволяют подтвердить его существенную роль в формировании генетической структуры изученных двух популяций. Конечно, коэффициенты инбридинга особей относительно изученной популяции и вида в целом, вычисленные для 7 полиморфных локусов, выше нуля (в среднем  $F_{is} = +0.106$  и  $F_{it} =$

$+0.136$ ). Но положительные значения индекса фиксации характерны для дуба черешчатого и в больших по объему популяциях [5, с. 186]. Так как вероятность самоопыления у дубов низка, дефицит гетерозигот объясняется семейной кластеризацией деревьев из-за небольшого радиуса распределения пыльцы и семян, сильного варьирования сроков фенологических фаз [4, с. 91]. Для южноуральских популяций коэффициент инбридинга в среднем на одну выборку составил  $F = +0.230$  [3, с. 30], то есть больше, чем в популяциях Kus и Ark с крайне малой численностью (для 7 полиморфных локусов  $F = +0.145$ ).

Изученные нами популяции, находящиеся вне основного ареала вида и обладающие уникальной генетической структурой, представляют интерес в качестве объектов сохранения генофонда. Безусловно, их в первую очередь нужно охранять *in situ*. Кроме того, семенной материал обоих насаждений мы рекомендуем использовать для искусственного лесовозобновления в условиях засушливого Башкирского Зауралья с сильно континентальным климатом. По проведенным наблюдениям в обоих насаждениях образуется достаточно много семян, формируется подрост. Использование в лесокультурных целях в регионе семенного материала из исследованных популяций (что будет сохранением генофонда популяций *ex situ*) представляется предпочтительнее из-за большей вероятности лучшей адаптации к местным жестким лесорастительным условиям.

**Список использованной литературы:**

1. Янбаев Ю.А., Байрамгулов Н.Р., Редькина Н.Н. и др. Межпопуляционная дифференциация родиолы ирмельской (*Rhodiola iremelica* Boriss., *Grassulaceae*) на Южном Урале // Генетика. – 2007. – Т. 43. – №11. – С. 1565-1570.
2. Янбаев Ю.А., Косарев М.Н., Бахтиярова Р.М. и др. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. – Уфа: БГУ, 2000. – 108 с.
3. Янбаев Ю.А. Эколого-популяционные аспекты адаптации лесобразующих видов к условиям природной и техногенной среды / Автореф. дисс. докт. биол. наук. – Тольятти: Институт экологии Волжского бассейна РАН, 2004. – 35 с.
4. Dicousso A., Michaud H., Lumaret R. Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. // Ann. Sci. – 1993. Vol. 50. Suppl. 1. 91s – 106s.
5. Kremer A., Petit R.J. Gene diversity in natural populations of oak species // Ann. Sci. For. – 1993. – Vol. 50 (Suppl. 1). – P. 186-202.
6. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding, and genetic resources. (Brown H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. eds.) – 1989. – P. 43-63.
7. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Heredity. 1981. V. 71. P. 281-283.

Статья рекомендована к публикации 08.01.08