



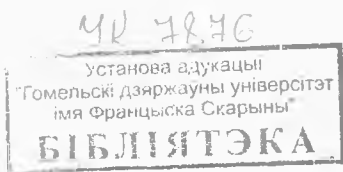
43,8/37
Г 657

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ФРАНЦИСКА СКОРИНЫ»

Г. Г. Гончаренко

**АНАЛИЗ
ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ
(на примере пихты белой в Беларуси)**

Учебно-методическое пособие



Гомель
2002

УДК 575.1:630*165:630*174 (075.8)

ББК 28.046я73

Г 657

Рецензенты:

Акад., проф. *В.Н. Решетников*

Чл.-корр. РАН, проф. *Л. И. Корочкин*

Рекомендовано научно-методическим советом УО «ГТУ им. Ф. Скорины»

Гончаренко Г. Г.

Г 657 Анализ популяционно-генетических ресурсов (на примере пихты белой в Беларуси): Учебно-методическое пособие /Отв.ред. Л.В. Хотыллева.— Гомель: УО «ГТУ им. Ф.Скорины», 2002. — 114 с. ISBN 985-6234-78-6.

Учебно-методическое пособие посвящено одному из направлений современной биологии — молекулярной популяционной генетике. В работе описан современный методический подход и все этапы анализа популяционно-генетических ресурсов. На примере пихт Палеарктики последовательно рассмотрены стадии сравнительного анализа генетической структуры, дифференциации, подразделенности, генного потока и генетического полиморфизма. Показаны возможности разработки практических рекомендаций и технологий, направленных на сохранение и восстановление генофондов конкретных популяций.

Предназначена для студентов и аспирантов специальности биология и генетика. Может быть использована для специальностей ботаника, зоология, охрана природы, заповедное дело, лесное, рыбное и охотничье хозяйство.

Табл. 12. Ил. 22.

УДК 575.1:630*165:630*174 (075.8)

ББК 28.046я73

© Г. Г. Гончаренко, 2002

Учреждение образования «Гомельский
государственный университет им.

Ф.Скорины», 2002

ISBN 985-6234-78-6

**Не может дерево доброе
приносить плоды худые,
ни дерево худое
приносить плоды добрые.**

*от Матвея
гл. 7, 18*

Предисловие

Еще в начале прошлого века было показано, что элементарной эволюционной единицей является **популяция**. К 30-м годам XX столетия при решающем вкладе отечественных генетиков С.С. Четверикова, Н.В. Тимофеева-Ресовского, П.Ф. Рокицкого, Н.П. Дубинина и др. в результате синтеза менделевской генетики и теории эволюции возникла новая наука - **популяционная генетика**. Впервые на экспериментальном уровне удалось установить, что в конечном итоге адаптационная и эволюционная пластичность всего живого сводится к **динамике генетического состава популяции**.

Усилиями нескольких поколений отечественных и зарубежных ученых в **настоящее время популяционная генетика** стала хорошо развитой областью биологических наук, которая позволяет не только изучать микроэволюционные процессы, но и дает возможность **разработать принципы управления генетическими ресурсами популяций хозяйственно-ценных видов**. Уже к концу 70-х годов исследователи начали применять четкий набор популяционно-генетических параметров, позволяющих **адекватно описать генетическую структуру популяций**, а также **оценить уровень генетического разнообразия** и, тем самым, **дать точную оценку состоянию генетических ресурсов различных популяций** (Левонтин, 1978; Айала, 1984). В основу этих исследований был положен **метод электрофоретического анализа изоферментов**, возникший на базе достижений биохимической и молекулярной генетики (Lewontin, Hubby, 1966; Prakash et al., 1969; Левонтин, 1978; Айала, 1984). В этой связи **освоение студентами биологических и лесоводческих факультетов высших учебных заведений основных параметров**, позволяющих проводить оценку состояния популяционных генофондов, крайне актуально и должно осуществляться в ходе **проведения лабораторных и практических занятий**, а также **при выполнении научных исследований в рамках курсового и дипломного проектирования**.

Несмотря на важность **современной популяционной генетики**, учебники и учебные пособия по этой дисциплине для студентов-биологов в отечественной литературе практически отсутствуют. Амери-

канское учебное пособие профессора Ф. Айалы «Введение в популяционную и эволюционную генетику», переведенное на русский язык и изданное в издательстве «Мир» в 1984 году и переизданное в 3-м томе «Современная генетика» Ф. Айала, Дж. Кайгер в 1988 году, стало библиографической редкостью.

Ввиду вышеизложенного, учебно-методическое пособие профессора Гончаренко Г.Г., ведущего отечественного специалиста в области молекулярной популяционной генетики, существенно **восполняет пробел** в наших представлениях, как об **истинных генетических процессах**, протекающих в природных популяциях, так и о **состоянии и методах изучения популяционных генофондов**.

Учебное пособие основано, главным образом, на материале пихты белой из Восточно-европейского региона и других пихт Палеарктики и состоит из 9 тематических глав (разделов). Несомненной удачей автора следует считать монографическое построение учебника, поскольку, исходя из нашего многолетнего опыта, именно этот подход позволяет более глубоко и осмысленно осваивать материал и развивать у студентов **навыки к самостоятельному творческому мышлению**.

На примере пихты белой в Беловежской пуще и других популяциях северо-восточной части ареала этого вида доступно и последовательно рассматриваются все **этапы анализа генетической структуры**, главных параметров генетического полиморфизма на основании которых дается точная оценка **состоянию популяционных генофондов** (главы 4, 5). Подробно и обстоятельно с широким привлечением иллюстративного материала приводятся **основные методы и технологии** современного популяционно-генетического анализа (глава 2). Сложные процессы **дифференциации генофондов, обмена генетическим материалом, подразделенности и оценка генного потока** рассматриваются в главах 6 и 7.

В пособии сквозь призму проблем, связанных с анализом генофондов и генетических процессов, протекающих в популяциях пихты белой в Восточноевропейском регионе, удачно освещен ряд более широких вопросов, касающихся **эволюционно-генетической истории и геносистематики пихт Палеарктики** (глава 8). Изложение этого материала в той или иной степени расширяет представление студентов об уровне генетической дифференциации, а также **филогенетических и таксономических взаимоотношениях** между пихтами старого

света, и, отчасти, позволяет ретроспективно проследить историю становления и развития пихты белой как видового представителя рода *Abies*.

Признаком хорошего тона следует считать то, что пособие заканчивается разделом, посвященным разработке технологий и конкретных рекомендаций, направленных на сохранение и восстановление генофонда уникальной эндемичной белорусской популяции пихты белой (глава 9).

К еще одному достоинству пособия следует отнести включение в виде отдельных блоков около 300 ключевых слов и генетических терминов, а также более 100 хорошо составленных задач и контрольных вопросов в конце каждого раздела.

В заключение следует добавить, что простой и ясный характер изложения достаточно сложного материала, четкость в постановке проблем, конкретные экспериментальные данные, привлекаемые автором для иллюстрации методов современного популяционно-генетического анализа генофондов, делают пособие не только полезным для студентов-биологов и лесоводов, на которых оно рассчитано, но и важным для исследователей-профессионалов, интересующихся современными проблемами управления популяционно-генетическими ресурсами. Пособие может быть также полезным для ученых генетико-ботанического профиля и специалистов в области заповедного дела, охраны природы и лесного хозяйства.

Академик НАН Б Л.В. Хотыльсва

Глава 1

Характеристика природной популяции пихты белой в Беловежской пуще

Пихта белая (*Abies alba* Mill.) — горное растение. Основная часть ее ареала находится в горных районах Европы, включая Карпаты, Альпы, Балканские горы, Аппенины и Пиренеи. На севере граница распространения этого вида проходит ориентировочно по 52⁰ с. ш., а на юге пихта белая доходит до северной Греции и южной Италии (Маценко, 1964; Liu, 1971; Vidakovic, 1991). Единственное известное в Беларуси место естественного произрастания пихты белой расположено на территории Беловежской пущи, в урочище Тисовик (кв. 562, Никорского л-ва) (рис. 1), на значительном удалении (более 100 км) от основного ареала. Ранее эта изолированная равнинная популяция была окружена труднопроходимым болотным массивом Дикий Никор, игравшим защитную и терморегулирующую роль, а кроме того, поддерживавшим в вегетационный период высокую влажность воздуха. В 50-х годах болота, окружающие урочище Тисовик, были переданы местному колхозу и осушены, а последнее автохтонное местопроизрастание пихты белой оказалось отрезанным от основного лесного массива Беловежской пущи и стало легко доступным для копытных, сильно повреждающих побеги у подроста.

В настоящее время, как участок с пихтой внутри Тисовика, так и само урочище обнесены оградами с целью сохранить подрост от повреждения копытными. Следует отметить, что древесный ярус в урочище Тисовик вместе с пихтой составляют ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst.), береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.) и береза повислая (*B. pendula* Roth.), граб обыкновенный (*Carpinus betulus* L.), клен остролистный (*Acer platanoides* L.), осина (*Populus tremula* L.), дуб черешчатый (*Quercus robur* L.), липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.), вяз шершавый (*Ulmus scarba* Mill.) и вяз гладкий (*U. laevis* L.), ольха черная (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), ясень обыкновен-



Рис. 1. Карта-схема Государственного национального парка “Беловежская пуца” с указанием месторасположения урочища Тисовик. Расположение урочища Тисовик показано стрелкой

венный (*Fraxinus excelsior* L.), ива козья (*Salix caprea* L.), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.). В 1995 году сотрудниками научного отдела ГНП “Беловежская пуца” было проведено описание **древостоя** на пробной площади в кв. 562. Выявлена следующая **характеристика древостоя**: состав первого яруса 4П2Е2Г1Кл1Вз+Ол, состав второго яруса — 6Г2Лп2Д+Е,Ос,Вз, ед.Кл,Я,Б. **Тип леса** определен как **пихтарник разнотравный** (Стрелков и др., 1996). В то же время, Корчик с соавторами (Korczyk et al., 1997) определяют тип леса как **грабняк липовый** (*Tilio-Carpinetum tipicum*). Необходимо отметить, что и ранее разные авторы не были едины во мнении о типе леса в Тисовике. Так Шкутко и Мартинович (1967) описывают тип леса как



Рис. 2. Схема урочища Тисовик (а) и выделенного участка произрастания пихты белой (б) с указанием номеров и месторасположения каждого дерева

дубняк елово-грабово-кисличный, Парфенов и Кузнецова (1975) — как ельник снытево-кисличный, а Будниченко с соавторами (1987) — как дубрава кисличная (первый ярус 4Д4Е1П1Ос+Кл, второй — 10Г+Кл). Исходя из собственных наблюдений в период посещения урочища в 1993–1996 годах, мы склонны считать, что тип леса здесь дубняк елово-грабово-кисличный (*Piceeto-Carpineto-Quercetum oxalidosum*) (Гончаренко, Савицкий, 2000). На самом же участке произрастания пихты белой (рис. 2), площадью всего в 1.2 га, можно в этом согласиться со Стрелковым с соавторами (1996), тип леса — пихтарник разнотравный.

Почва на участке дерново-подзолистая супесчаная, развивающаяся на мелкозернистом пылевато-песчанистом связном песке, подстилаемом супесью. Почвообразующие породы представлены песчаными отложениями, покрытыми маломощными наносами супеси. После завершения мелиоративных работ вокруг урочища активизировались процессы оподзоливания (Стрелков и др., 1996).

В настоящее время в урочище Тисовик произрастает 20 деревь-

Таблица 1. Характеристика деревьев *Abies alba*, произрастающих в квартале 562 по состоянию на 1992 год (по Koczuk et al., 1997)

Номер дерева	Возраст (лет)	Диаметр (см)	Высота (м)	Высота кроны (м)	Дефолиация (%)
1	-	70.5	35.5	27	30
2	-	68.5	36.0	26	20
3	-	74.0	38.0	26	25
4	-	51.0	33.0	20	20
5	138	87.0	42.0	28	30
6	154	82.0	36.0	28	35
7	144	72.5	32.5	23	25
8	112	69.5	33.5	26	20
9	138	49.5	32.0	21	15
11	109	84.0	38.0	23	35
12	136	64.5	34.0	26	25
13	-	85.0	33.5	21	20
15	123	54.5	29.5	17	20
16	136	60.0	34.0	19	15
17	123	86.5	36.5	25	30
18	-	68.5	34.5	20	30
21	106	43.5	28.0	17	20
22	-	71.0	36.0	27	30
23	-	61.5	33.0	21	25
29	-	58.0	33.5	24	30

ев пихты белой, месторасположение которых указано на рис. 2. Ряд морфологических параметров и возрастные характеристики некоторых деревьев представлены в табл. 1. Как следует из данных таблицы размеры деревьев колеблются от 28 м в высоту и 43 см в диаметре у дерева № 21 до 42 м в высоту и 80 см в диаметре у дерева № 5. Интересно отметить, что минимальные размеры характерны для дерева № 21, которое оказалось самым молодым имея возраст 106 лет. В то же время самое крупное дерево № 5 имело возраст 138 лет и не являлось самым старым в насаждении (табл. 1).

В 1995 году наблюдалось хорошее семеношение пихты в природной популяции Беловежской пуци. Полученные результаты, касающиеся плодоношения и биологических показателей семян *A. alba* в насаждении урочища Тисовик (Гончаренко, Савицкий, 2000), представлены в табл. 2. Из данных этой таблицы видно, что наиболее интенсивное

Таблица 2. Плодоношение и биологические показатели семян *Abies alba* в урочище "Тисовик" в 1995 году

Номер дерева	Цветение ¹ в мае 1995г		Учёт шишек ¹ в августе 1995г	Урожай шишек в сентябре 1995г		Среднее число семян в шишке	Вес 1000 семян г	Пустых семян в %	Пораженность созревших семян вредителями в %	Выход доброкачеств. семян в %
	пыльнички	шишки		всего	собрано					
1	80 ² /50 ³	30 ² /30 ³	30 ² /50 ³	258	175	304.0	62.8	80.0	35.7	12.9
2	70/30	20/30	20/30	142	90	236.0	62.4	67.7	70.0	9.7
3	80/40	?	10/10	170	120	336.7	52.1	50.8	90.3	4.8
4	30/30	10/10	10/10	253	135	215.2	59.6	66.7	20.0	26.7
5	50/50	20/10	20/20	149	80	268.5	58.6	65.0	61.9	13.3
6	70/30	30/20	20/10	57	35	174.9	62.3	45.0	45.5	30.0
7	40/50	20/30	20/30	255	155	296.1	69.8	56.0	36.4	28.0
8	60/30	20/20	20/20	195	105	281.6	85.2	55.0	11.1	40.0
9	70/60	20/10	10/10	220	150	210.6	45.8	65.2	82.5	6.1
11	70/20	20/10	20/10	230	160	163.9	68.0	50.8	90.8	4.5
12	80/60	30/30	10/10	175	160	274.1	65.5	68.3	87.0	4.1
13	60/60	20/20	20/30	115	75	278.2	60.9	60.0	82.4	7.1
15	60/10	20/20	20/20	197	182	250.6	55.3	55.3	66.7	14.9
16	50/70	10/30	10/20	185	170	277.2	50.6	72.2	87.8	3.4
17	100/50	10/20	10/20	356	256	294.6	58.9	55.1	72.7	12.2
18	70/40	20/20	20/20	210	130	273.9	60.6	54.5	85.0	6.8
21	60/30	10/10	10/10	94	84	197.7	48.0	57.8	77.8	9.4
22	70/50	20/10	20/10	90	80	211.8	54.0	39.0	83.3	10.2
23	80/50	10/10	10/10	116	106	218.7	46.0	48.7	94.9	2.6
29	50/30	20/20	10/10	230	130	258.5	59.1	56.0	89.8	4.5

Примечание. 1) данные получены от д-ра А. Корчика; 2) отношение площади занимаемой зоной с пыльниками или шишками к площади всей кроны в %; 3) отношение площади занимаемой пыльниками или шишками к площади зоны в %.

цветение (как мужское, так и женское) наблюдалось у деревьев № 1 и № 12, а максимальное обилие **пыльников** было у дерева № 17 (табл. 2). **Урожай шишек**, в целом хороший, сильно варьировал — от 57 до 356 шишек на дерево. Такие, общепринятые биологические показатели как **вес 1000 семян** (в среднем равняясь 59.3 г, он колебался от 46.0 г до 85.2 г), а также **число семян на одну шишку** (в среднем 251.1) оказались не ниже, чем у вида в целом (48 г и 260 семян на шишку, соответственно) (Справочник по лесосеменному делу, 1978). Это косвенно свидетельствует о том, что несмотря на малые размеры данной популяции пихты ее биологические показатели существенно не снижены и не наблюдается сильного **эффекта инбридинга**. В тоже время, по-видимому, именно малым числом деревьев в популяции объясняется высокий **процент пустых** (неоплодотворенных) **семян** — от 39.0 до 80.0% (в среднем 58.5%).

Очень велика была в 1995 году **пораженность созревших семян вредителями** — от 11.1 до 94.9% (в среднем 68.6%). В основном семена поражены **еловым короткохвостым семяедем** (*Megastigmus strobilobius* Ratz.) и в небольшой степени **пихтовой галицей-семяедем** (*Rosseliella piceae* Seit.). В целом же, **выход доброкачественных семян** в этой популяции пихты невелик (12.6%) и сильно варьирует от дерева к дереву (2.16 – 40.0%). Необходимо отметить, что у дерева № 8 наблюдался наибольший вес семян, наименьшая пораженность семян вредителями и соответственно наибольший процент доброкачественных семян. Тогда как наибольшая пораженность семян вредителями оказалась у дерева № 23, у которого вес семян являлся одним из самых низких (табл. 2).

Ключевые слова и понятия

<i>Abies alba</i> Mill. ареал граница распространения вида место произрастания Беловежская пуца урочище Тисовик изолированная популяция Дикий Никор древесный ярус описание древостоя характеристика древостоя тип леса	пихтарник разнотравный грабняк липовый дубняк елово-грабово-кисличный ельник снытево-кисличный дубрава кисличная почвообразующие породы почва дерново-подзолистая супесчаная процессы оподзоливания 20 деревьев пихты белой морфологических параметров возрастные характеристики
---	--

семеношение	эффект инбридинга
плодоношение	процент пустых семян
биологические показатели семян	пораженность созревших семян
насаждение	еловый короткохвостый семяед
пыльник	пихтовая галица-семяед
урожай шишек	выход доброкачественных семян

Вопросы к главе 1

1. Обрисуйте границы ареала распространения пихты белой (*Abies alba* Mill.)
2. Укажите место естественного произрастания пихты белой в Беларуси.
3. Дайте характеристику древостоя и укажите тип леса в урочище Тисовик и на участке произрастания пихты белой.
4. Опишите древесные породы, произрастающие совместно с *A. alba* в урочище Тисовик.
5. Какое количество деревьев пихты белой произрастает на территории ГПП "Беловежская пушча"?
6. Приведите морфологические параметры и возрастные характеристики деревьев пихты белой, произрастающей в урочище Тисовик.
7. Дайте характеристику плодоношения пихты белой в природной популяции Беловежской пушчи.

Литература

1. Будниченко Н. И., Стрелков А. З., Сяевич Ф. Ф., Михалевич П. К. Пихта белая в Беловежской пушче/ Заповедники Белоруссии: Исследования. Мн.: Ураджай, 1987. Вып. 11. С. 13–24.
2. Гончаренко Г. Г., Савицкий Б. П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2000. 122 с.
3. Маценко А. Е. Пихты восточного полушария/ Флора и систематика высших растений. Вып. 13. (Труды Ботанического института имени В. Л. Комарова. Серия I). М., Л.: Наука, 1964. С. 3–103.
4. Шарфенов В. И., Кузнецова В. П. Влияние антропогенных факторов на флору Беловежской пушчи/ Беловежская пушча: Исследования. Мн.: Ураджай, 1975. Вып. 9. С. 48–72.
5. Справочник по лесосеменному делу/ Под ред. Новосельцевой А. И. М.: Лесн. пром., 1978. 336 с.
6. Стрелков А. З., Ромانيук И. Г., Дворак Л. Е. Состояние и перспективы воспроизводства и охраны пихты белой (*Abies alba* Mill.) в Беловежской пушче/ Сохранение биологического разнообразия лесов Беловежской пушчи. Каменюки–Минск. 1996. С. 122–130.
7. Шкутко Н. В., Мартинович Б. С., Пихта белая в Белоруссии/ Дендрология и лесоведение. Мн.: Наука и техн., 1967. С. 77–81.
8. Korczyk A., Kawecka A., Martysiewicz V.V., Strelkov A.Z. Naturalne stanow-

isko jodly pospolitej (*Abies alba* Mill.) w Puszczy Białowieskiej// Prace Instytutu Badawczego Lesnictwa, seria A, Warszawa. 1997. Nr. 837. P. 27-62.

9 Liu T. S. A Monograph of Genus *Abies*. Taipel, Taiwan, 1971. 608 p.

10 Vidaković M. Conifers Morphology and Variation. Zagreb: Grafički zavod Hrvatske, 1991. 765 p.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Глава 2

Методический подход к исследованию популяционно-генетических ресурсов хвойных

Выбор метода

Хвойные виды состоят из системы в той или иной мере связанных между собой популяций, каждая из которых обладает собственным генофондом, передающимся потомкам по определенным генетическим законам. Несмотря на то, что хвойные леса в Восточной Европе являются важнейшими самовозобновляющимися природными ресурсами, популяционно-генетические исследования основных лесообразующих пород на данной территории до недавнего времени не проводились и достижения популяционной генетики в лесном хозяйстве практически не применялись. В то же время точная информация о состоянии популяционно-генетических ресурсов является основополагающей для разработки научных принципов современной стратегии лесовосстановления и лесного ссменоводства.

Усилиями нескольких поколений ученых в настоящее время популяционная генетика стала хорошо развитой областью биологических наук, которая позволяет не только изучать микроэволюционные процессы, но и дает возможность разработать принципы управления генетическими ресурсами популяций хозяйственно-ценных видов. Уже к концу 70-х годов исследователи начали применять четкий набор популяционно-генетических параметров, позволяющих адекватно описать генетическую структуру популяций, а также оценить уровень генетического разнообразия и тем самым дать точную оценку состоянию генетических ресурсов различных популяций (Левонтин, 1978; Айала, 1984). В основу этих исследований был положен метод электрофоретического анализа изоферментов, возникший на базе достижений биохимической и молекулярной генетики (Lewontin, Hubby, 1966; Prakash et al., 1969; Левонтин, 1978; Айала, 1984). Достоинство

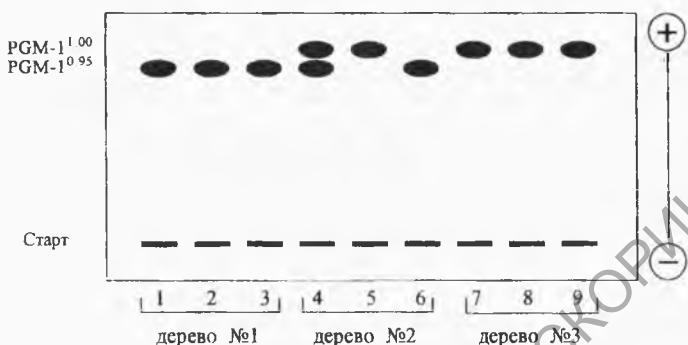


Рис.3. Схематическое изображение электрофореграммы фосфоглюкомутазы-1 из образцов диплоидной (дорожки 1, 4, 7) и гаплоидной (дорожки 2, 3, 5, 6, 8, 9) ткани трех различных деревьев пихты белой

этого метода состоит в том, что по числу и расположению гистохимически окрашенных фракций на специальных гелевых пластинах можно непосредственно судить о генах, кодирующих тот или иной фермент, и безошибочно устанавливать генотипы анализируемых особей.

На рис. 3 представлена схема типичной электрофореграммы (гелевая пластина), полученной в результате электрофоретического фракционирования и гистохимического выявления фермента фосфоглюкомутазы-1 (PGM-1) из диплоидных и гаплоидных тканей трех различных деревьев пихты белой. На гелевой пластине хорошо видно, что дерево № 2 обладает **гетерозиготным генотипом** (т.е. имеет два различных аллельных варианта — PGM-1^{1.00} и PGM-1^{0.95}), а два других дерева обладают **гомозиготными генотипами** различного класса (т.е. каждый из них имеет по два идентичных аллеля, в случае дерева № 1 это PGM-1^{0.95}, а дерева № 3 — PGM-1^{1.00}).

Сходным способом определяются генотипы и по генам, кодирующим другие ферменты. Таким образом, типирование генотипов того или иного дерева с помощью метода изоферментов по большому набору генов становится доступной процедурой для любого исследователя. Анализ достаточно большой выборки деревьев из какого-либо природного насаждения позволяет определить **генетическую структуру**

туру данной популяции, а при исследовании нескольких таких выборок из различных частей ареала — оценить генетическую структуру изучаемого вида в целом. Генетическая структура является эволюционно сложившейся характеристикой, которая может быть описана как в частотах генотипов, так и в частотах встречаемости аллелей, формирующих эти генотипы. Исследователи обычно используют более удобную и компактную форму описания популяционной структуры в виде аллельных частот. В первую очередь, это связано с тем, что соотношение частот генотипов в конкретных выборках может сильно отклоняться от генеральных значений по чисто стохастическим причинам, в то время как аллельные частоты более устойчивы относительно эффективности выборочности (Животовский, 1983).

За последние десятилетия в процессе развития генетики природных популяций сформировался четкий математический аппарат, который на основе электрофоретических данных позволил количественно оценивать основные популяционно-генетические параметры.

Одним из параметров, определяющих уровень генетической изменчивости в популяциях, является доля полиморфных локусов, или полиморфность (P), которая рассчитывается как отношение числа полиморфных локусов (имеющих два и более различных аллеля) к общему количеству проанализированных локусов. Данный показатель обычно вычисляется по двум критериям полиморфности. В одном случае локус считается полиморфным, когда частота наиболее общего аллеля этого локуса не превышает 95% (P_{95}), а в другом — когда его частота не превышает 99% (P_{99}). Необходимо отметить, что этот показатель зависит от выборки проанализированных деревьев и, вследствие этого, не всегда точно отражает уровень генетической изменчивости в исследованных популяциях.

Более совершенной мерой, оценивающей уровень генетической изменчивости в популяциях, является показатель гетерозиготности, который практически не зависит ни от выборки деревьев, ни от процентного критерия, что имеет место в случае показателя полиморфности. В популяционных исследованиях используют параметр наблюдаемой гетерозиготности (H_o), рассчитываемый для каждого локуса отдельно как отношение числа гетерозигот к общему количеству проанализированных особей, и параметр ожидаемой гетерозиготности (H_e), который вычисляется для каждого локуса на основании его аллельных частот посредством следующего соотношения:

$$H_e = 1 - \sum x_i^2$$

где x_i — частота i -того аллеля.

Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности вычисляются как среднеарифметическое показателей H по всем локусам:

$$\bar{H} = \frac{1}{L} \sum H_j$$

где H_j — гетерозиготность j -того локуса, а L — количество исследованных локусов.

При генетическом анализе популяций широко используется также показатель, называемый **средним числом аллелей на локус (A)**. Для вычисления этого параметра число всех найденных в исследовании аллелей делится на количество локусов. Так как A сильно зависит от выборки деревьев, генетики-популяционисты часто пользуются еще и показателем **среднего числа нередких аллелей на локус ($A_{1\%}$)**. При этом делить на количество локусов следует только число аллелей, которые встречаются в популяции с частотой более 1% (т.е. нередких аллелей). Параметры среднего числа аллелей на локус позволяют дать усредненную оценку аллельного разнообразия, характерного для той или иной популяции, а также для вида в целом.

Все вышеперассмотренные параметры, включая аллельные частоты, позволяют описать генотипическую структуру, выявить уровень генетической изменчивости и тем самым дают возможность оценить состояние **генофонда** исследуемых видов и популяций.

Наряду с изучением общего уровня изменчивости перед генетиками-популяционистами стоит не менее важный вопрос о том, как распределяется изменчивость в пределах исследуемых видов и популяций. Известно, что основная масса семян хвойных обычно падает на землю и прорастает возле материнских деревьев. В результате этого рядом стоящие деревья в природных насаждениях так или иначе являются более родственными друг к другу, чем остальные. Таким образом, как вид может состоять из различных популяций, имеющих различную генетическую структуру, так и каждая популяция хвойных в свою очередь может **подразделяться** на группировки или семьи (субпопуляции), которые также могут иметь собственную генетическую структуру в результате более частого скрещивания между родственными деревьями.

Для анализа степени **подразделенности** природных популяций хвойных исследователи пользуются коэффициентами, предложенными Райтом (F-статистики) и Неи (G-статистики) (Wright, 1965; Nei, 1975).

Еще в 1923 году Сьюэл Райт ввел специальный коэффициент для определения уровня инбридинга и назвал его индексом “фиксации”. **Коэффициент инбридинга для отдельного локуса** вычисляется по формуле:

$$F = 1 - H_o / H_e,$$

где H_o — наблюдаемая гетерозиготность, а H_e — ожидаемая гетерозиготность. Позднее Райт предложил еще несколько показателей: F_{IS} — коэффициент инбридинга особи (I) относительно популяции или субпопуляции (S); F_{IT} — коэффициент инбридинга особи (I) относительно вида в целом (T); F_{ST} — коэффициент инбридинга популяции или субпопуляции (S) относительно всего вида (T) (Алтухов, 1989).

Для расчета F_{ST} используют значения аллельных частот, а для F_{IS} — показателей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Необходимо отметить, что если в рассматриваемых популяциях проанализировано разное количество деревьев, то рассчитывается взвешенная средняя.

В целом **показатель F_{IS}** для одного локуса вычисляется по формуле:

$$F_{IS} = \sum_{q=1}^K (N_q / N_t) F_q,$$

где F_q — коэффициент инбридинга для данного локуса в q-той популяции, в которой проанализировано N_q деревьев; N_t — общее количество деревьев по всем K популяциям.

Значения F_{IS} , подсчитанные для каждого локуса, затем усредняются по всем проанализированным локусам.

Другой важный **показатель подразделенности** — F_{ST} , который, собственно, и определяет степень подразделенности, для каждого локуса вычисляется в два этапа.

На первом этапе подсчитывается F_{ST} для каждого аллеля по определенному локусу:

$$F_{STi} = \frac{\sigma_{x_i}^2}{\bar{x}_i (1 - \bar{x}_i)},$$

где $\bar{x}_i$ — взвешенная средняя частота i-того аллеля по всем исследованным популяциям; $\sigma_{x_i}^2$ — взвешенная сумма квадратичных откло-

нений частот i -того аллеля в популяциях от средней частоты этого аллеля, или в математическом выражении:

$$\sigma_{x_i}^2 = \sum_{q=1}^K (N_q / N_1) (x_{iq} - \bar{x}_i)^2,$$

где x_{iq} — частота i -того аллеля в q -той популяции, K — число исследованных популяций.

На втором этапе проводится усреднение значений F_{ST} по всем аллелям данного локуса:

$$F_{ST} = \frac{1}{R} \sum_{i=1}^R F_{STi},$$

где R — количество аллелей в локусе.

После вычисления F_{ST} для каждого локуса их значения усредняются для всех проанализированных локусов.

Еще один показатель Райта F_{IT} рассчитывается на основании значений F_{IS} и F_{ST} . Эти три показателя связаны между собой следующей формулой:

$$F_{IT} = F_{ST} + (1 - F_{IS})F_{ST}.$$

Следовательно, F_{IT} для каждого локуса вычисляется путем подстановки значений F_{IS} и F_{ST} в данную формулу с последующим усреднением полученных величин для всех локусов.

В последних работах, посвященных анализу природных популяций хвойных, исследователи все чаще используют **G-статистики**, разработанные Ней (Nei, 1975). В отличие от F-статистик G-статистики имеют более простой биологический смысл и расчет их менее трудоемок. Последнее обстоятельство имеет немаловажное значение, особенно если количество анализируемых популяций достаточно велико.

G-статистики состоят из нескольких параметров. Основными являются: H_T — общее генетическое разнообразие, H_S — среднее генетическое разнообразие внутри популяции, D_{ST} — генетическое разнообразие между популяциями и G_{ST} — доля межпопуляционного разнообразия.

Общее генетическое разнообразие H_T для каждого локуса вычисляется на основании средних частот аллелей:

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^R \bar{x}_i^2,$$

где $\bar{x}_i$ — средняя взвешенная частота i -того аллеля по всем популяциям, R — количество аллелей в локусе.

H_S для определенного локуса представляет собой средневзвешенное значение показателя ожидаемой гетерозиготности по всем изученным популяциям:

$$H_S = \sum_{q=1}^K (N_q / N_1) H_{eq},$$

где H_{eq} — ожидаемая гетерозиготность в q -той популяции, K — количество проанализированных популяций.

Разница между общим генетическим разнообразием и внутрипопуляционным разнообразием составляет D_{ST} , или **межпопуляционное разнообразие**:

$$D_{ST} = H_T - H_S.$$

Для того чтобы оценить, какая доля общего генетического разнообразия приходится на **межпопуляционное разнообразие**, используется коэффициент G_{ST} :

$$G_{ST} = D_{ST} / H_1.$$

Все вышеперечисленные параметры G -статистик рассчитываются для каждого локуса отдельно, а затем усредняются по всем проанализированным локусам.

Вычисление показателей подразделенности позволяет не только проанализировать структурированность популяций и вида, но и определить величину генного потока между популяциями. Как было показано (Slatkin, 1985a), **интенсивность генного потока** между популяциями связана с F_{ST} следующим соотношением:

$$N_e m = \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}},$$

где $N_e m$ — число мигрантов на поколение.

Таким образом, рассчитав значение F_{ST} и подставив его в данную формулу, можно легко определить количество мигрантов, которыми обмениваются исследованные популяции хвойных в течение одного поколения.

Имеется еще один метод, позволяющий оценивать величину генного потока, предложенный американским исследователем Монгмери Слаткиным (Slatkin, 1985a,b; Barton, Slatkin, 1986). В этом случае расчет производится на основании частот уникальных (встретившихся только в одной популяции) аллелей по следующей формуле:

$$\log_{10} N_e m = \frac{\log_{10} \bar{p}(1) - b}{a},$$

где $\bar{p}(1)$ — средняя частота уникальных аллелей, a и b — коэффициенты. Для выборки деревьев равной 10, 25 и 50 коэффициент a равен -0.489 , -0.576 и -0.612 , соответственно, а коэффициент b равен -0.951 , -1.11 и -1.21 , соответственно. Поскольку, фактическая средняя популяционная выборка при исследованиях практически всегда не будет равна 10, 25 или 50, то $N_e m$ необходимо скорректировать в зависимости от количества проанализированных деревьев. Отношение выборки (10, 25 или 50), по которой производился расчет, к конкретному среднепопуляционному количеству изученных деревьев равно отношению полученной величины $N_e m$ к скорректированному значению $N_e m^*$.

Рассмотренные выше F - и G -статистики позволяют определить, имеется ли подразделенность в популяциях того или иного вида пихт. Однако они не отвечают на вопрос, какие из исследованных популяций более сходны между собой, а какие отличаются и в какой степени. Иными словами, на основании F - и G -статистик нельзя определить дифференциацию в популяциях.

Для анализа генетической дифференциации разработано несколько коэффициентов. Наиболее удобный способ оценки генетической близости и дифференциации по данным электрофореза предложил Ней (Nei, 1972). При этом учитываются различия в аллельных частотах всех проанализированных локусов. Для количественной оценки обычно используется коэффициент генетической дистанции Ней (D_N):

$$D_N = -\ln I_N, \quad I_N = \frac{\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij} y_{ij}}{\sqrt{(\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij}^2) (\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R y_{ij}^2)}},$$

где x_{ij} и y_{ij} — частоты i -того аллеля j -того локуса сравниваемых популяций.

Если D_N равно 0, то популяции идентичны. Чем больше значение D_N , тем менее родственны сравниваемые популяции. Считается, что коэффициент дистанции Ней самый точный, и поэтому он используется практически всеми исследователями.

Для наглядного изображения общей картины генетических взаимоотношений между всеми исследованными популяциями на осно-

вании полученных коэффициентов обычно строятся дендрограммы. Построение дендрограмм осуществляется различными способами, из которых наиболее распространенным является невзвешенный парногрупповой метод кластерного анализа (UPGMA).

Еще одним достоинством коэффициента генетической дистанции Неи (D_N) является то, что он позволяет рассчитывать время дивергенции (t) исследуемых популяций, а также таксонов различного ранга исходя из следующего соотношения:

$$t = \frac{D_N}{2 c n \lambda},$$

где c — доля аминокислотных замещений, которая может быть определена посредством электрофореза, n — общее количество кодонов, связанных с синтезом полипептида, и λ — средняя скорость аминокислотных замещений (Nei, 1971). Согласно Неи (1971), $t = 7.4 \times 10^5 D_N$. Можно также использовать другую оценку временной шкалы, предложенной Неи в 1975 году, где $t = 5 \times 10^6 D_N$ (Nei, 1975).

Таким образом, на основании электрофоретического анализа изоферментов, используя приведенные выше параметры, в настоящее время исследователи получили возможность точно определять величину генетической изменчивости, степень подразделенности, интенсивность межпопуляционного генного потока, уровень дифференциации и время дивергенции. При этом, как отмечается в фундаментальных работах Левонтина (1978) и Айалы (1984), наиболее точные оценки в генетико-популяционных и эволюционных исследованиях можно получить лишь при соблюдении следующих условий:

1. Необходимо, чтобы выборка в каждой популяции обеспечивала материал **около 50 геномов дикого типа** на локус (в случае диплоидных нхт это составляет около 25 деревьев).

2. Анализировать материал необходимо **только из природных популяций**.

3. Количество используемых для анализа **локусов** должно быть **не менее 18–20**.

4. Необходимо, чтобы **выборка локусов** была **максимально разнообразной** и исключала слишком высокий удельный вес всего одной или двух ферментных систем.

5. В анализ не должны включаться локусы с заранее известной изменчивостью (принцип **несмещенной выборки локусов**).

Этапы электрофоретического анализа изоферментов

Принципы электрофоретического разделения

Принцип электрофореза основан на том, что каждая белковая (ферментная) молекула обладает собственным размером, молекулярным весом, а главное — зарядом. На основании этих различий и происходит разделение белков под действием электрического поля. Заряд белковых молекул формируется за счет аминокислот, которых насчитывается двадцать. Часть из них — лизин, аргинин и отчасти гистидин — несут положительный заряд, другие — глютаминовая и аспарагиновая кислоты — отрицательный.

Электрофоретическая подвижность молекулы белка зависит от заряда (величина заряда от pH); от размера и формы молекул (чем компактнее и мельче, тем больше их подвижность — уменьшается трение и взаимодействие с гелем); от типа и размера гелей (эффект молекулярного сита — крупные молекулы движутся в геле тем медленнее, чем меньше размер пор, определяемый числом поперечных сшивок), и ионной силы буфера.

В настоящее время электрофоретические исследования проводятся в различных гелях (поддерживающих средах) — агаровом, полиакриламидном, крахмальном и др. Наиболее широкое применение в популяционной и эволюционной генетике получил электрофорез в **крахмальном геле**. Это связано с простотой приготовления геля и возможностью анализировать сразу несколько ферментов в разных срезах одного гелевого блока.

Генетическая символика

Первоначально термином **изоферменты**, или **изозимы**, называли любые фракции одного фермента, обладающие одинаковой ферментной специфичностью и выявляемые после электрофоретического фракционирования и гистохимического окрашивания у особей одного вида. Согласно принятой номенклатуре (IUPAC–IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1971), для обозначения всех белков, обладающих одной и той же ферментативной специфичностью и выявляемых у одного вида, необходимо употреблять термин “множественные молекулярные формы фермента” (ММФФ), а **изоферментами** следует называть только генетически детерминированные ММФФ. Для электрофоретических вариантов, которые являются аллельными

продуктами одного локуса, Пракашем с соавторами (Prakash et al., 1969) предложен термин **аллоферменты**, или **аллозимы**.

В ходе исследования восточноевропейских популяций пихты белой вся используемая генетическая символика была основана на принципах, заложенных в работе Левонтина и Хабби (Lewontin, Hubby, 1966) и достигших своей законченной формы в работе Пракаша с соавторами (Prakash et al., 1969). Обозначение фермента составляется из наиболее употребляемого его названия в сокращенном виде прописными латинскими буквами. При обозначении соответствующего локуса первая прописная буква остается без изменения, а остальные заменяются на строчные: GDH—Gdh (глутаматдегидрогеназа), IDH—Idh (изоцитратдегидрогеназа).

Если одному ферменту соответствует несколько фракций, которые могут кодироваться разными генами, то в случае хвойных они нумеруются арабскими цифрами в порядке уменьшения их электрофоретической подвижности, например, аспартатаминотрансфераза — AAT-1, ..., AAT-3. Кроме этого, как в случае эстераз, добавляются еще буквы, отражающие субстратную специфичность данного фермента (FL-EST — флюоресцентная эстераза). Для обозначения аллозимов и соответствующих им аллелей используют цифровые символы, которые пишутся в надстрочнике и отражают относительную электрофоретическую подвижность ферментов. Символом 1.00 обозначается аллель, который наиболее часто встречается в данном локусе. Остальные аллели этого локуса обозначаются в соответствии с электрофоретической подвижностью их аллозимов относительно аллозима 1.00. Например, Idh^{1.30} — ген аллозима, подвижность которого на 30% быстрее Idh^{1.00}.

Электрофоретическое оборудование

Электрофоретическое фракционирование проводится в специально изготовленных для этого камерах. В настоящее время в арсенале исследователей имеется большое количество электрофоретических камер различной конструкции (вертикальные, горизонтальные и др.), но при этом во всех типах камер всегда присутствуют отдельные емкости для анодного и катодного буфера, место для размещения гелевого блока, система обеспечения контакта буфер—гель, а также система охлаждения, поддерживающая постоянную температуру геля. Достаточно подробно конструкции некоторых камер показаны в ряде специальных монографий (Корочкин и др., 1977; Cheliak, Pitel, 1984; Левитес, 1986; Гончаренко и др., 1989; Гончаренко, Силин, 1997).

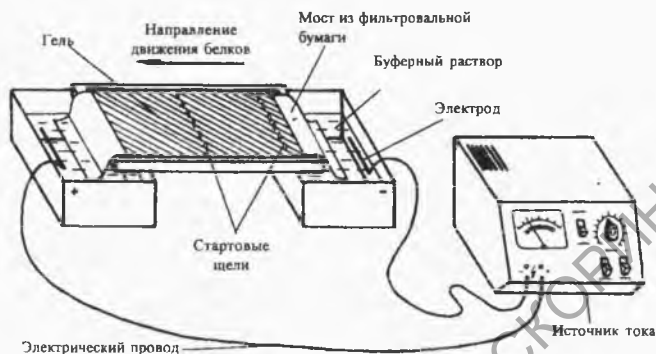


Рис. 4. Схематическое изображение камеры для горизонтального электрофореза в крахмальном геле

На рис. 4 схематически изображена наиболее простая камера для горизонтального электрофореза в крахмальном геле, которая успешно применялась в течение многих лет при исследовании различных видов хвойных.

Источниками питания при электрофорезе обычно служат отечественные выпрямители типа УИП-1, УИП-2 и БГ-50 или зарубежные типа PS-250, PS-2000 фирмы "Sigma" и др. В качестве материала для электродов практически всегда используется платиновая проволока. Режим подачи тока от источника питания и время электрофореза подбирают эмпирически. Главное, чтобы не было перегрева гелевого блока, что ведет к инактивации ферментов и искажению результатов. Поэтому электрофорез необходимо проводить в холодной комнате или холодильнике. Нагрев геля определяется силой тока, которая не должна превышать 4 мА на 1 см длины гелевого блока. Сила тока в системе значительно зависит от используемого буфера.

Буферные системы

Основными характеристиками буферных систем являются pH, буферная емкость и ионная сила. Наиболее важной является pH буфера, поскольку в зависимости от pH меняется и направление движения ферментов в геле. Буферная емкость дает возможность системе сохранить постоянную pH раствора, несмотря на появление различных продуктов электролиза в ходе процессов электрофореза. Чем больше буферная емкость растворов в системе, тем устойчивее сохраняет система свои химические характеристики. Ионная сила раствора зависит, в основном, от концентрации ионов и рассчитывается по формуле $CZ^2/2$, где C — молярная концентрация иона, а Z — его заряд.

В связи с тем, что каждая буферная система рассчитана на электрофоретический анализ только определенных ферментов, исследователи обычно используют в работе несколько систем, которые подбирают эмпирически, в зависимости от анализируемых ферментов. Для электрофоретического анализа популяций

пихты белой наиболее оптимальными (Гончаренко, Савицкий, 2000) оказались три буферные системы:

(А) Трис-ЭДТА-боратная, pH 8.6 — *электродный буфер* включает 900 мМ трис-(оксиметил)-аминометан, 500 мМ борную кислоту, 20 мМ ЭДТА, 40 мМ $MgCl_2$, *гелевый буфер* готовится путем разведения 50 мл электродного буфера до 1 л дистиллированной водой;

(В) Трис-цитрат, pH 6.2/Трис-HCl, pH 8.0 — *электродный буфер* включает 233 мМ трис-(оксиметил)-аминометан и 86.15 мМ лимонную кислоту, *гелевый буфер* содержит 500 мМ трис-(оксиметил)-аминометан гидрохлорид, pH доводят 1N NaOH;

(С) Трис-цитратная, pH 6.2 — *электродный буфер* включает 233 мМ трис-(оксиметил)-аминометан, 86.15 мМ лимонную кислоту, *гелевый буфер* готовится путем разведения 35 мл электродного буфера до 1 л дистиллированной водой.

Приготовление геля и подготовка образцов

Для приготовления геля навеску гидролизованного крахмала помещают в коническую термостойкую колбу. Туда же заливают гелевый буфер. Как правило, готовят 12–13%-ный крахмальный гель. Для того чтобы улучшить механические свойства и избежать подгорания крахмала, добавляют 10% сахарозы.

Гель непосредственно после варки заливают в кюветы и оставляют на 20–30 минут для полимеризации при комнатной температуре. После этого гель помещают на 30–40 минут в холодильник (1–5°C) для дальнейшей полимеризации.

В готовом гелевом блоке специальным стартовым ножом пробиваются прорези (дорожки) для нанесения образцов (рис. 5). В стартовые прорези вставляются кусочки ватмана 3ММ, пропитанные гомогенатами образцов.

Некоторые исследователи при анализе ряда ферментов предпочитают размещать образцы на двух стартовых линиях одного блока, причем вторая линия обычно пробивается на середине геля. В этом случае за один форец удастся проанализировать в два раза больше образцов. Так, при использовании кюветы для геля, имеющей ширину 192 мм, одновременно можно анализировать 64 образца тканей хвойных.

Основной задачей в ходе приготовления образцов для электрофоретического фракционирования является сохранение в нативном состоянии ферментов и белков при обязательном разрушении клеточных мембран.

Гомогенизация растительных тканей проводится в специальных гомогенизаторах при температуре от 0 до 5°C. Для охлаждения гомогенизаторов обычно используются холодильные элементы. Тип гомогенизатора, который применяется в некоторых лабораториях, схематически изображен на рис. 5. Гомогенизация (размельчение) образцов хвойных проводится в экстрагирующем растворе и осуществляется в матированных лунках гомогенизатора при помощи специального стеклянного пестика (рис. 5), который вращается посредством электрического ротора. **Экстрагирующий раствор** имеет следующий состав: 1 мл тритона X-100, 0.2 мл β -меркаптоэтанола в 100 мл дистиллированной воды.

После гомогенизации часто проводят центрифугирование с целью очищения гомогенатов путем осаждения мембран, пластид и других крупных частиц.

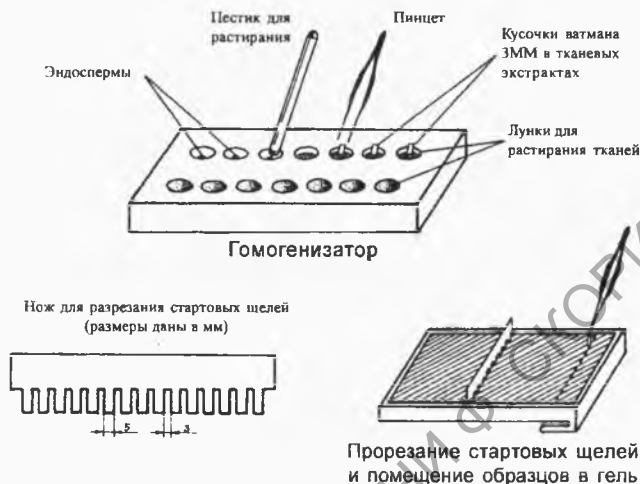


Рис. 5. Гомогенизация и размещение образцов в гелевом блоке

Центрифугирование особенно необходимо при анализе твердых тканей, таких как хвоя, почки и корешки, поскольку в этом случае трудно провести качественную гомогенизацию и в гомогенате остается большая масса крупных частиц.

Наиболее удобными для анализа у хвойных являются ткани эндоспермов и зародышей, так как они содержат ферменты в большой концентрации и могут сохраняться в холодильнике несколько лет. Гомогенаты эндоспермов и зародышей наносятся на кусочки ватмана 3ММ и затем помещаются в гелевый блок (рис. 5) без предварительного центрифугирования.

Проведение электрофореза и выявление изоферментов на гелях

После того как все образцы размещаются в гелевом блоке, кювета с гелем помещается в электрофоретическую камеру. Для проведения электрофореза необходимо обеспечить контакт геля с анодным и катодным отсеками, заполненными буферами. В случае горизонтальной камеры контакт геля как с анодным, так и с катодным отсеками осуществляется посредством специальных мостов (рис. 4). Крахмальный гель в горизонтальной камере накрывается изолирующей лавсановой или полиэтиленовой пленкой, предохраняющей его от высыхания.

Электроды, помещенные в электродные растворы, подключаются к источнику постоянного тока. Напряжение, силу тока и время проведения электрофореза для каждой буферной системы подбирают эмпирически. При исследовании пихт Палеарктики наиболее оптимальными оказались следующие условия проведения электрофореза: в буферной системе А в течение 3.5 или 14 ч при параметрах тока 500 В/60 мА и 180 В/19 мА соответственно; в буферной системе В в течение 3 или 14 ч при параметрах тока 280 В/80 мА и 90 В/25 мА

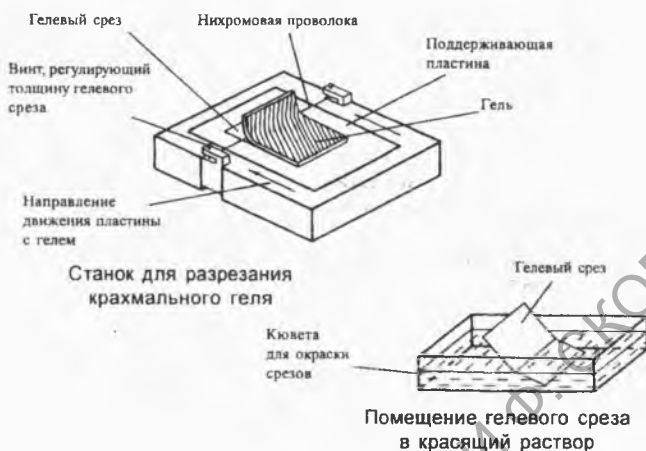


Рис. 6. Разрезание гелевого блока и окрашивание гелевых срезов

соответственно; в буферной системе С в течение 3 или 12 ч при параметрах тока 260 В/50 мА и 80 В/15 мА соответственно.

По окончании электрофореза из стартовых щелей гелевого блока пинцетом удаляются кусочки ватмана 3ММ, а сам гель высвобождается из кюветы. Затем готовый гелевый блок помещается на стеклянную поддерживающую пластину и на специальном станке разрезается на несколько горизонтальных срезов при помощи тонкой нихромовой проволоки (рис. 6). Толщина каждого гелевого среза регулируется специальным винтом, изменяющим высоту расположения нихромовой нити.

Из гелевого блока толщиной 10–12 мм можно получить 6–8 срезов, каждый из которых помещается в отдельную кювету для гистохимического окрашивания того или иного фермента.

Методы выявления изоферментов основаны на том, что после электрофоретического фракционирования положение отдельных ферментов в гелевом блоке остается постоянным. В то же время все каталитические свойства, характерные для данного фермента, полностью сохраняются, если не нарушены меры, предохраняющие ферменты от денатурации.

Гистохимическое выявление определенного фермента осуществляется в кюветках, содержащих специальный инкубационный раствор. Гистохимический раствор готовится на буфере, имеющем рН, при котором активность исследуемого фермента максимальна, и содержит субстрат, на который действует этот фермент и, если необходимо, кофермент и активатор. Важнейшим компонентом гистохимического раствора является краситель, который вступает в соединение с продуктом ферментативной реакции и выпадает в виде нерастворимого осадка в местах локализации фермента. Эту реакцию, протекающую в окрашиваемом геле, можно записать в следующем виде:

Фермент

Субстрат $\downarrow \rightarrow$ Продукт + Краситель $\rightarrow$ Окрашенная фракция
(раств.) (нераств.)

Первоначально удавалось выявлять только пептидазы, эстеразы, и фосфатазы, действующие на искусственные субстраты и имеющие достаточно простые методы гистохимического окрашивания. В основе гистохимического выявления этих ферментов лежат реакции взаимодействия нафтилов, которые образуются при расщеплении субстратов с диазониевыми красителями.

Спектр выявляемых в результате электрофореза изоферментов резко возрос после того, как был разработан метод гистохимического окрашивания дегидрогеназ. Электрофоретические фракции НАД- и НАДФ-зависимых ферментов, обладающих дегидрогеназной активностью, окрашиваются при помощи тетразолиевых красителей, которые в ходе ферментативной реакции под действием восстанавливающих веществ превращаются в окрашенный нерастворимый формазан. Схематическое изображение процесса гистохимического выявления дегидрогеназ представлено на рис. 7.

Быстрое развитие техники окрашивания ферментов, включая проведение сложных окрасок — с добавлением к основной двух и более вспомогатель-



Рис. 7. Схема гистохимического окрашивания дегидрогеназ

ных ферментативных реакций, дало возможность анализировать около 100 ферментов (Harris, Hopkinson, 1978). В некоторых случаях выявление ферментов в гелях проводится при облучении электрофореграмм ультрафиолетовым светом. Коферменты НАД и НАДФ не видны в ультрафиолетовом свете, а восстановленные формы НАДН и НАДФН флюоресцируют. Поэтому, просматривая гелевый блок под ультрафиолетом, можно видеть светящиеся зоны на голубовато-синем фоне в местах расположения ферментов. Также под ультрафиолетовым светом анализируется флюоресцентная эстераза и кислая фосфатаза, которые выявляются при помощи умбеллиферилловых субстратов.

Подробное описание состава гистохимических окрашивающих растворов для выявления различных ферментов хвойных приведено в работах, опубликованных ранее (Conkle et al., 1982; Cheliak, Pitel, 1984; Гончаренко и др., 1989; Гончаренко, Силин, 1997).

В ходе электрофоретического исследования материала пихты белой все процессы гистохимического выявления ферментов проводились при температуре 30–37°C и в темноте, поскольку используемые химические красители чувствительны к свету.

Процесс развития гистохимического окрашивания различных ферментов у пихты белой обычно протекает в течение 30–90 мин. Гистохимические

реакции необходимо останавливать при наиболее четком проявлении фракций окрашиваемого фермента. Для этого при окраске в кювете остатки гистохимического раствора удаляют, а гель несколько раз промывают холодной водой, после чего заливают 50 мл **фиксирующей жидкости**, имеющей следующий состав: 100 мл глицерина и 30 мл уксусной кислоты (лед.) в 1 литре водного раствора.

Ключевые слова и понятия

электрофоретический анализ гетерозиготный генотип гомозиготный генотип генетическая структура частота генотипов частота встречаемости аллелей локус полиморфность наблюдаемая гетерозиготность ожидаемая гетерозиготность число аллелей на локус генофонд подразделенность коэффициент инбридинга генетическое разнообразие межпопуляционное разнообразие генный поток (N_m) уникальные аллели редкие аллели дифференциация	генетическая дистанция дендрограмма кластерный анализ время дивергенции гель изоферменты горизонтальный электрофорез буферные системы гомогенизация экстрагирующий раствор эндосперм зародыш гистохимическое выявление субстрат кофермент активатор дiazониевые красители дегидрогеназа тетразолиевые красители фиксирующая жидкость
---	---

Вопросы и задачи к главе 2

1. Как можно описать генетическую структуру популяций.
2. Чем отличаются показатели **ожидаемой** и **наблюдаемой** гетерозиготностей.
3. Какие **показатели** необходимо вычислить для оценки **состояния генофонда** исследуемых видов и популяций.
4. Как можно вычислить величину **генного потока** в природных популяциях.
5. Привести и объяснить формулу **генетической дистанции Ней (Dn)**.
6. На каких показателях основывается расчет **времени дивергенции (t)** для исследованных популяций и других таксономических единиц.
7. Какие **пять условий** необходимо учитывать для получения **точных оценок** при вычислении **популяционно-генетических параметров**.

8. На чем основывается принцип электрофоретического разделения белковых молекул?

9. Что такое **изоферменты** (дать определение, привести примеры)?

10. Изложить принципы **генетической символики**. Привести примеры обозначения локусов и аллелей.

Литература

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику: М.: Мир, 1984. 230 с.
2. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Наука, 1989. 328 с.
3. Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гос. ком. СССР по лесу. Гомель: Полеспечать, 1989. 164 с.
4. Гончаренко Г. Г., Силин А. Е. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири. Мн.: Тэхналогія, 1997. 191 с.
5. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях// Итоги науки и техники. Серия общая генетика. Т. 8. Теоретическая популяционная генетика. М.: ВИНТИ, 1983. С. 76–104
6. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.
7. Левитес Е. В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука, 1986. 144 с.
8. Левонтин Р. Генетические основы эволюции: М.: Мир, 1978. 352 с.
9. Cheliak W. M., Pitel J. A. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species. Ottawa: Canadian Forestry Service, 1984. 49 p.
10. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The Nomenclature of multiple forms of enzymes// Arch. Bioch. Biophys. 1971. V. 147. P. 1–3.
11. Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*// Genetics. 1966. V. 54. P. 595–609.
12. Nei M. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity// Am. Nat. 1971. V. 105. P. 385–398.
13. Nei M. Genetic distance between populations// Am. Nat. 1972. V. 106. P. 283–292.
14. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: Holland Press, 1975. 278 p.
15. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*// Genetics. 1969. V. 61. P. 841–858.
16. Slatkin M. Gene flow in natural populations// Ann. Rev. Ecol. Syst. 1985. V. 16. P. 393–430.
17. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating// Evolution. 1965. V. 19. P. 395–420.

Глава 3

Электрофоретический анализ и генетический контроль ферментных систем пихты белой

Освоить методы электрофоретического разделения и гистохимического выявления фракций того или иного фермента еще не достаточно для того, чтобы непосредственно переходить к решению задач, связанных с анализом популяционно-генетических ресурсов. Необходимо провести генетическую детерминацию полученных на электрофореграммах ферментных спектров. Иными словами нужно четко установить какие аллели кодируют каждую фракцию. Следует отметить, что электрофоретический анализ изоферментов пихты белой в той или иной степени уже проводился в различных лабораториях в предыдущие годы (Schroder, 1989; Fady, Conkle, 1992; Longauer, 1994; Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995; Гончаренко, Падутов, 1995). Однако наборы используемых ферментных систем и их генетическая интерпретация в работах различных авторов несколько отличались, что в определенной степени затрудняет сопоставление и использование полученных ранее результатов. В связи с этим корректная генетическая детерминация является необходимым первым этапом для последующих популяционно-генетических исследований пихты белой.

Электрофоретический анализ материала 220 деревьев из семи природных популяций *A. alba* проводился по 15 ген-ферментным системам. Название ферментов, кодовый номер согласно изданию "Нomenclатура ферментов" (1979), предпочитаемая для анализа буферная система, а также количество используемых локусов приведены в табл. 3.

Как уже отмечалось, в предыдущей главе в качестве экспериментального материала при электрофоретическом фракционировании служили ткани гаплоидных эндоспермов и диплоидных зародышей. Для определения генотипа каждого дерева проводился анализ 8-20 эндос-

Таблица 3. Ферменты, их кодовый номер, буферные системы и количество локусов, использованные для анализа популяций пихты белой

Фермент	Аббревиатура	Кодовый номер	Используемая буферная система	Количество локусов
Аспаратаминотрансфераза	AAT	2.6.1.1.	A, B	3
Гексокиназа	HK	2.7.1.1.	A	1
Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.1.2.	A	1
Глюкозофосфатизомераз	GPI	5.3.1.9.	B, C	1
Диафараза	DIA	1.6.4.3.	B	2
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42.	B	1
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1.	A, B	2
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37.	B, C	2
Малик-энзим	ME	1.1.1.40.	A	1
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1.	A	2
Флюоресцентная эстераза	FL-EST	3.1.1.2.	A, B	1
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44.	B, C	2
Сорбитолдегидрогеназа	SDH	1.1.1.14.	A	1
Пептидаза	PEP	3.4.13.11.	A	1
Шикиматдегидрогеназа	SKDH	1.1.1.25.	B	1

пермов, которые выбирались случайно из набора семян, полученного как минимум из пяти шишек, собранных из различных частей кроны дерева. Так как **вероятность ошибки** в определении **гетерозиготного дерева** рассчитывается из соотношения $P=0,5^{n-1}$ (где n -количество проанализированных эндоспермов), то даже при анализе 8 эндоспермов ошибка составляет менее 1%.

Аллельный характер вариантов, найденных у пихты белой, был установлен на основании анализа их расщепления у гаплоидных эндоспермов гетерозиготных деревьев. В силу **законов мейоза** гетерозиготное по какому-либо ферментному локусу дерево должно образовывать гаплоидные эндоспермы, несущие альтернативные **электрофоретические аллельные варианты** в соотношении 1:1. Дополнительный анализ диплоидных зародышей и в ряде случаев зимних почек, чей электрофоретический спектр у гетерозиготных деревьев должен быть представлен двумя различными аллельными вариантами, также использовался для подтверждения генетической природы найденных электрофоретических вариантов у пихты белой.

Ниже приводится описание 15 ген-ферментных систем, использо-

ванных при анализе восточноевропейских природных популяций *A. alba*.

Фосфоглюкомутаза

Фосфоглюкомутаза пихты белой на электрофореграммах была представлена двумя зонами активности - PGM-1 и PGM-2. При этом интенсивно окрашивающаяся, быстро мигрирующая зона PGM-1 в гаплоидных тканях являлась в виде одной фракции, тогда как медленная PGM-2, зачастую, двумя. В ходе анализа материала пихты белой из восточноевропейских природных популяций удалось обнаружить по два электрофоретических различных варианта в каждой зоне. Эти варианты, обозначенные в соответствии с их электрофоретической подвижностью PGM-1^{0.95} и PGM-1^{1.00}, а также PGM-2^{1.00} и PGM-2^{1.10} хорошо видны на фореграмме, которая представлена на рис. 8.

Аллельный характер найденных вариантов был установлен на основе их расщепления в гаплоидных эндоспермах гетерозиготных деревьев. Суммарные данные расщепления по всем гетерозиготным деревьям приведены в табл. 4. Как следует из таблицы электрофоретические варианты PGM-1 расщепляются в отношении 54:79, а PGM-2 в отношении 242:202, что в целом соответствует ожидаемому 1:1 (табл. 4) и указывает на генетическую природу обнаруженных вариантов. При анализе диплоидных тканей гетерозиготных образцов на фореграммах всегда присутствовали оба электроморфа, тем самым также подтверждая аллельный характер найденных вариантов. Следует добавить, что изменение подвижности фракций PGM-1 никогда не затрагивало подвижность фракций PGM-2, и наоборот. Таким образом, полученные результаты однозначно свидетельствуют о двухлокусном контроле ферментной системы фосфоглюкомутазы у пихты белой, причем каждый локус экспрессируется независимо от другого и имеет по два кодоминантных аллеля.

Два изменчивых локуса PGM у *A. alba* и некоторых других видов пихт Палеарктики были описаны ранее рядом исследователей (Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999).



Рис. 8. Электрофореграмма фосфоглюкомутазы из эндоспермов *A. alba* (дорожки 2-15) и *A. sibirica* (дорожки 1, 16, 17): 1, 16, 17 — PGM-1^{0.90} PGM-2^{1.20}, 2 — PGM-1^{0.95} PGM-2^{1.10}, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12 — PGM-1^{1.00} PGM-2^{1.00}, 5 — PGM-1^{1.00} PGM-2^{1.10}, 8, 10, 13-15 — PGM-1^{0.95} PGM-2^{1.00}

Изоцитратдегидрогеназа

Данный фермент выявлялся на фореграммах двумя зонами активности. При этом быстро мигрирующая зона окрашивалась слабо и непостоянно и в дальнейшем анализе не учитывалась. Электрофоретический спектр основной зоны **изоцитратдегидрогеназы** в гаплоидных тканях *A. alba* представлен одиночными четкоокрашенными фракциями с различной электрофоретической подвижностью: IDH^{100} и IDH^{130} . В нескольких гаплоидных образцах одного дерева было отмечено отсутствие ферментативной активности, что указывает на наличие так называемого **нулевого варианта** IDH^0 , форма фермента которого не способна осуществлять химическую реакцию. Анализ расщепления трех выявленных вариантов подтвердил их аллельный характер наследования, поскольку соотношение во всех случаях соответствовало менделеевскому 1:1 (табл. 4). Как хорошо видно на рис. 9, электрофоретический спектр в образцах диплоидных тканей, гетерозиготных по ферментативно активным аллельным вариантам у пихты белой представлен тремя фракциями. Причем, характер экспрессии фракций всегда соответствовал биномиальному 1:2:1. В случае димерной структуры фермента верхняя и нижняя фракции являются альтернативными **гомодимерами**, каждый из которых состоит из двух одинаковых субъединиц фермента, а промежуточная, с более интенсивной окраской, возникает при взаимодействии двух разных субъединиц и является **гетеродимером**, количество которого всегда в два раза больше чем гомодимера. Выявленный трехфракционный спектр и биномиальный характер экспрессии подтверждают имеющиеся данные (Schroder, 1989; Hussendorfer et al., 1995) о димерной структуре молекулы фермента изоцитратдегидрогеназы у *A. alba*.

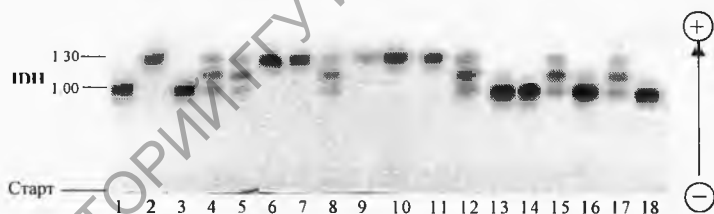


Рис. 9. Электрофореграмма изоцитратдегидрогеназы из зародышей *A. alba*: 1, 3, 13, 14, 16, 18 — $IDH^{100/100}$; 2, 6, 7, 9-11 — $IDH^{130/130}$; 4, 5, 8, 12, 15, 17 — $IDH^{100/130}$

Необходимо отметить, что **полиморфизм** по локусу, кодирующему основную зону изоцитратдегидрогеназы был выявлен также в других работах, посвященных генетическим исследованиям пихты белой (Longauer, 1994; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999). В то же время ряд исследователей учитывают еще один полиморфный локус *ldh* и таким образом используют два локуса *ldh-1* и *ldh-2* в ходе генетического анализа популяций (Schroder, 1989; Breitenbach-Dorfer et al., 1992; Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995).

Аспаргатаминотрансфераза

При гистохимическом окрашивании гелей на **аспаргатаминотрансферазу** было выявлено три зоны ферментативной активности, обозначенные ААТ-1,

ААТ-2 и ААТ-3. Наименее подвижная зона ААТ-3 в отличие от других всегда проявлялась двумя фракциями. Изменение подвижности в каждой из зон не влияло на подвижность электрофоретических вариантов других зон, что указывает на самостоятельность ААТ-1, ААТ-2 и ААТ-3. В ходе исследований популяций пихты белой по всем зонам был обнаружен полиморфизм. Быстрая и средняя зоны имели по два электрофоретических варианта: ААТ-1^{0.90}, ААТ-1^{1.00} и ААТ-2^{0.90}, ААТ-2^{1.00} соответственно. В медленной зоне было обнаружено три варианта: ААТ-3^{1.00}, ААТ-3^{2.60} и ААТ-3^{5.00}. Анализ расщепления электрофоретических вариантов подтвердил их генетическую детерминацию (табл. 4). Три полиморфных локуса, кодирующих данную ген-ферментную систему, также были описаны рядом авторов (Hussendorfer et al., 1995; Longauer, 1994). Гетерозиготные по какому-либо из локусов зародыши на фореграмме выявлялись тремя фракциями, что соответствует димерной структуре активной молекулы ААТ. Димерная структура аспаратаминотрансферазы определена и для других представителей рода *Abies* (Neale, Adams, 1981; Shea, 1988; Pascual et al., 1993).

Лейцинаминопептидаза

Лейцинаминопептидаза на электрофореграммах выявлялась двумя зонами активности с четко очерченными фракциями (рис. 10). Изменение подвижности зон происходило асинхронно, что указывает на их независимость. По обеим зонам, обозначенным как LAP-1 и LAP-2, в изученных популяциях был выявлен полиморфизм. При этом было найдено по три электрофоретических варианта: LAP-1^{0.95}, LAP-1^{1.00}, LAP-1^{1.05} и LAP-2^{0.95}, LAP-2^{1.00}, LAP-2^{1.05}. Генетический анализ гаплоидных (табл. 4) образцов показал, что все выявленные варианты являются аллельными продуктами двух локусов, хотя наблюдалось небольшое отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 в сочетаниях вариантов 0.95:1.00, 1.00:1.05 у Lap-1 и 1.00:1.05 у Lap-2 (табл. 4). В гетерозиготных образцах диплоидных тканей LAP-1 и LAP-2 всегда были представлены двумя электрофоретическими аллельными вариантами. Спектры гетерозиготных по локусу Lap-2 зародышей хорошо видны на рис. 10 (образцы 4 и 12). Двухфракционный спектр лейцинаминопептидазы в гетерозиготных образцах диплоидных тканей указывает на мономерную структуру данного фермента.

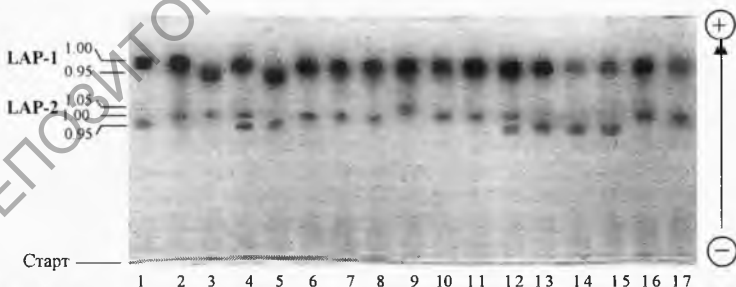


Рис. 10. Электрофореграмма лейцинаминопептидазы из эндоспермов (доржки 1-3, 5-9, 13-17) и зародышей (доржки 4, 10-12) *A. alba*: 1, 13-15 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{0.95}; 2, 6-8, 16, 17 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 3 — LAP-1^{0.95} LAP-2^{1.00}; 4, 12 — LAP-1^{1.00/1.00} LAP-2^{0.95/1.00}; 5 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00/1.00}; 6 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.05}; 7 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 8 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.05}; 9 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 10, 11 — LAP-1^{1.00/1.00} LAP-2^{1.00/1.00}; 12 — LAP-1^{1.00/1.00} LAP-2^{1.00/1.00}; 13 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 14 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 15 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 16 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}; 17 — LAP-1^{1.00} LAP-2^{1.00}.

Таблица 4. Расщепление электрофоретических аллельных вариантов у гетерозиготных деревьев *A. alba*

Локус	Сочетание аллелей	Расщепление	χ^2	Локус	Сочетание аллелей	Расщепление	χ^2
Idh	0/1.00	3:5	0.50	Hk	1.00/1.10	15:15	0.00
	1.00/1.30	377:411	1.47	Me	0.95/1.00	187:261	12.22***
Skdh	1.00/1.10	6:2	2.00	Lap-1	0.95/1.00	107:140	4.41*
6-Pgd-1	0.90/1.15	3:5	0.50		0.95/1.05	4:8	1.33
	1.00/1.15	457:513	3.23		1.00/1.05	42:23	5.55*
6-Pgd-2	0.80/1.00	36:40	0.21	Lap-2	0.95/1.00	159:138	1.48
Gpi	1.00/1.25	25:23	0.08		0.95/1.05	9:15	1.50
Fe	0.90/1.00	3:5	0.50		1.00/1.05	153:108	7.76**
Aat-1	0.90/1.00	5:7	0.33	Gdh	1.00/1.10	10:8	0.22
Aat-2	0.90/1.00	10:14	0.67	Mdh-2	0.80/1.00	42:40	0.05
Aat-3	1.00/2.60	102:111	1.03	Dia-1	0/1.00	26:10	7.11**
	1.00/5.00	5:3	0.50	Pep	0.90/1.00	43:48	0.27
Pgm-1	0.95/1.00	54:79	4.70*		1.00/1.05	5:13	3.56
Pgm-2	1.00/1.10	242:202	3.60				

* Уровень значимости <0.05 , ** — <0.01 , *** — <0.001

Необходимо подчеркнуть, что в ряде работ, посвященных исследованию пихты белой с использованием изоферментов, также были описаны два изменчивых локуса, кодирующих лейцинаминопептидазу (Mejnartowicz et al., 1994; Hussendorfer et al., 1995; Mejnartowicz, 1996).

Глюкозофосфатизомераза

Данный фермент выявлялся на фореграммах двумя зонами ферментативной активности. Быстро мигрирующая зона окрашивалась диффузно и была исключена из дальнейшего анализа. Медленно мигрирующая зона была представлена двумя трехфракционными электрофоретическими вариантами GPI¹⁰⁰ и GPI¹²⁵, причем последний вариант был найден только в одной популяции, а во всех остальных насаждениях полиморфизм отсутствовал. Анализ расщепления вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных образцов не показал достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1, что четко указывает на аллельный характер их наследования. Дополнительные исследования диплоидных тканей также подтвердили как генетическую природу найденных вариантов, так и димерную структуру глюкозофосфатизомеразы у пихт (Neale, Adams, 1981; Jacobs et al., 1984; Pascual et al., 1993; Fady, Conkle, 1992; Hussendorfer et al., 1995). Следует отметить, что все перечисленные авторы используют для популяционно-генетического анализа два локуса, кодирующих ген-ферментную систему GPI.

Глутаматдегидрогеназа

Глутаматдегидрогеназа на электрофореграммах выявлялась в виде одной зоны активности с четко очерченными тонкими фракциями. В ходе анализа восточноевропейских природных популяций *A. alba* удалось обнаружить два

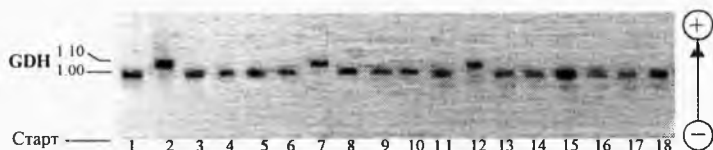


Рис. 11. Электрофореграмма глутаматдегидрогеназы из эндоспермов *A. alba*: 1, 3-6, 8-11, 13-18 — GDH^{1.00}, 2, 7, 12 — GDH^{1.10}

различных электрофоретических варианта по GDH. Электрофореграмма, демонстрирующая выявленные варианты в гаплоидных эндоспермах пихты белой представлена на рисунке 11. Проведенный генетический анализ показал, что данный фермент у пихты белой кодируется одним локусом с кодоминантными аллелями Gdh^{1.00} и Gdh^{1.10} (табл. 4). На электрофореграммах индивидуальные спектры гетерозиготных зародышей представляют собой одну диффузную зону, что, по-видимому, соответствует мультимерной структуре фермента глутаматдегидрогеназы, которая была выявлена и у других видов хвойных.

6-Фосфоглюконатдегидрогеназа

Данный фермент из эндоспермов *A. alba* выявлялся на геле двумя зонами. Каждый вариант быстро мигрирующей зоны выявлялся в виде трехфракционного спектра, в то время как варианты медленной зоны были представлены единичными четко очерченными фракциями. В ходе исследования материала деревьев *A. alba* удалось обнаружить три различных электрофоретических варианта в быстрой зоне — 6-PGD-1^{0,90}, 6-PGD-1^{1.00}, 6-PGD-1^{1.15} и два в медленной — 6-PGD-2^{0,80}, 6-PGD-2^{1.00}. Наблюдаемое расщепление найденных вариантов 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в эндоспермах гетерозиготных деревьев не отличалось от ожидаемого 1:1 (табл. 4). Это указывает на генетическую природу выявленных вариантов. Необходимо отметить, что изменение подвижности в каждой из зон 6-фосфоглюконатдегидрогеназы носило асинхронный характер, тем самым подчеркивая двухлокусный контроль данной ферментной системы у пихты белой.

Наличие двух локусов 6-Pgd у *A. alba* было описано широким кругом исследователей (Bergmann, Kownatzski, 1987; Schroder, 1989; Breitenbach-Dorfer et al., 1992; Hussendorfer et al., 1995; Longauer, 1994). Два локуса, кодирующих 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, было выявлено также у палеарктических пихт *Abies pinsapo* Boiss., *A. nordmanniana* (Stef.) Spach., *A. nephrolepis* Maxim., *A. semenovii* B. Fedtsch., *A. sibirica* Ledeb. (Pascual et al. 1993; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999), и неарктической *A. fraseri* (Pursh) Poir. (Jacobs et al., 1984). В тоже время в ряде работ, посвященных изучению таких видов пихт, как *A. balsamea* (L.) Mill. и *A. borisii-regis* Mattf., отмечается наличие только одного локуса 6-Pgd (Neale, Adams, 1981; Fady, Conkle, 1992).

Малатдегидрогеназа

При гистохимическом окрашивании гелей на малатдегидрогеназу были выявлены две основные зоны ферментативной активности. Быстро мигрирующая анодная зона, обозначенная как MDH-1, в изученных популяциях оказалась мономорфной. В медленной катодной зоне было обнаружено два электрофоретических варианта: MDH-2^{0.80} и MDH-2^{1.00}. Анализ расщепления электро-

форетических вариантов подтвердил их генетическую детерминацию (табл. 4). Гетерозиготные по данному локусу зародыши на фореграмме выявлялись тремя фракциями, что соответствует димерной структуре ферментативно активной молекулы MDH.

Следует подчеркнуть, что в отличие от елей и двухвойных сосен, где анализ MDH не вызывает особых затруднений (Гончаренко и др., 1989; Гончаренко, 1999) малатдегидрогеназа у пихт является одной из наиболее сложных для интерпретации ген-ферментных систем, поскольку имеется определенное перекрывание между электрофоретическими аллельными вариантами обеих основных зон (см. рис. 12). Кроме того, на фореграммах можно видеть еще одну слабоокрашенную зону MDH, которая также располагается в районе перекрывания двух основных зон. По-видимому, этот момент является главной причиной того, что различные авторы используют неодинаковое количество локусов Mdh при генетическом анализе *A. alba*.

Например, в работах Лонгауэра (Longauer, 1994) и в исследованиях Гончаренко с соавторами (Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999) у *A. alba* учитываются два структурных гена, кодирующих малатдегидрогеназу. Некоторые авторы описывают три локуса Mdh у этого вида (Breitenbach-Dorfer et al., 1992; Hussendorfer et al., 1995). Интересно, что и в других исследованиях по различным видам пихт имеются разногласия, касающиеся количества генов, кодирующих данную ферментную систему. Так, Кормутак и Янг (Kormutak, Yang, 1998) при популяционно-генетическом анализе дальневосточных пихт учитывают три локуса, в то время как ряд исследователей при изучении североамериканских и азиатских представителей рода *Abies* используют только два гена (Neale, Adams, 1981; Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, 1999).

Флюоресцентная эстераза

Данный фермент на электрофореграммах выявлялся только при освещении ультрафиолетовым светом в виде одной основной четкой флюоресцирующей зоны, обозначенной как FL-EST. Полиморфизм по флюоресцентной эстеразе удалось обнаружить только в одной из всех проанализированных популяций. Причем, было найдено только два электрофоретических варианта: FL-EST^{0.90} и FL-EST^{1.00}. Анализ расщепления вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных деревьев не показал достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1, что четко указывает на аллельный характер их наследования (табл. 4). Выявленный трехфракционный спектр в гетерозиготных зародышах говорит о димерной структуре молекулы фермента флюоресцентная эстераза у *A. alba*.

Нельзя не отметить тот факт, что Мейнартовичу при анализе 8 польских насаждений *A. alba* не удалось обнаружить полиморфизм по гену (Fle), кодирующему флюоресцентную эстеразу (Mejnartowicz, 1996). Отсутствие данных по FL-EST в других работах, посвященных генетическим исследованиям пихты белой, не позволяет более обстоятельно провести сравнительный анализ этой ген-ферментной системы у данного вида.

Шикиматдегидрогеназа

При гистохимическом окрашивании гелей на шикиматдегидрогеназу была выявлена одна зона ферментативной активности, представленная двумя вариантами: SKDH^{1.00} и SKDH^{1.10}. Анализ расщепления электрофоретических вариантов подтвердил их генетическую детерминацию (табл. 4). Необходимо подчеркнуть, что в большинстве проанализированных популяций присутствовал лишь

основной аллель — $Skdh^{100}$, в то время как альтернативный — $Skdh^{110}$ встретился только в одном насаждении.

Довольно низкая вариабельность этого локуса или полное отсутствие изменчивости в популяциях *A. alba* также были описаны еще рядом авторов (Bergmann, Kownatzski, 1987; Schroder, 1989; Hussen-dorfer et al., 1995).

Гексокиназа

Гексокиназа на электрофореграммах выявлялась в виде одной зоны активности со слабоокрашенными тонкими фракциями. В ходе анализа восточноевропейских природных популяций *A. alba* удалось обнаружить полиморфизм по НК, который был представлен двумя электрофоретическими вариантами: NK^{100} и NK^{110} . Из таблицы 4 хорошо видно, что расщепление этих вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных деревьев соответствует ожидаемому соотношению 1:1. В целом, проведенный генетический анализ показал, что гексокиназа у пихты белой кодируется одним локусом с кодоминантными аллелями NK^{100} и NK^{110} .

Следует отметить, что не удалось обнаружить в научной литературе какой-либо информации о ферментной системе гексокиназы у пихты белой.

Сорбитолдегидрогеназа

Данный фермент выявлялся в виде трех зон активности. Электрофоретический спектр основной, быстро мигрирующей зоны был представлен одиночными четкоочерченными фракциями. Окраска двух медленно мигрирующих зон (данные зоны выявлялись также при гистохимическом окрашивании на алкогольдегидрогеназную активность) зачастую носила диффузный характер, что послужило поводом к исключению этих зон из дальнейших исследований. Во всех исследованных популяциях пихты белой зона сорбитолдегидрогеназы оказалась мономорфной, т.е. была представлена только одним электрофоретическим вариантом SDH^{100} . Хотелось бы отметить, что у *A. nordmanniana*, близкородственного к *A. alba* вида, полиморфизм по этому локусу крайне низок, в то время как у сибирской и дальневосточных пихт изменчивость данного гена определенно высока (Тончаренко, 1999).

Малик-энзим

При гистохимическом окрашивании гелей на малик-энзим была обнаружена одна зона ферментативной активности. Электрофоретический спектр выявленной зоны в гаплоидных тканях *A. alba* представлен одиночными четкоокрашенными фракциями с различной электрофоретической подвижностью: ME^{100} и ME^{095} . В некоторых гаплоидных образцах у ряда деревьев было отмечено отсутствие ферментативной активности, что указывает на наличие так называемого нулевого варианта ME^0 , форма фермента которого не способна осуществлять химическую реакцию. Проведенный генетический анализ гаплоидных образцов показал, что все выявленные варианты являются аллельными продуктами одного гена, хотя наблюдалось отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 в сочетании вариантов Me^{095} и Me^{100} (табл. 4).

Диафораза

Диафораза у пихты белой выявлялась тремя основными зонами ферментативной активности. Быстро мигрирующая зона была представлена одиночными, интенсивно окрашенными фракциями. В исследованных популяциях по DIA-1 обнаружено два электрофоретических варианта: DIA-1¹⁰⁰ и ферментативно

неактивный — DIA-1⁰. В ходе анализа расщепления выявленных вариантов в гаплоидных образцах наблюдалось отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 (табл. 4). Средняя зона зачастую окрашивалась слабо и непостоянно, и в дальнейших исследованиях во внимание не принималась. Медленно мигрирующая зона во всех проанализированных насаждениях оказалась мономорфной по варианту DIA-3^{1.00}.

Хотелось бы отметить, что диафораза является достаточно сложной для интерпретации ген-ферментной системой. Это связано с тем, что субстраты, применяющиеся для гистохимического окрашивания DIA, могут быть использованы и некоторыми другими ферментными системами. Так, в работе Хассендорфера с соавторами (Hussendorfer et al., 1995) проводился сравнительный анализ полученных электрофореграмм диафоразы, менадионредуктазы и NADH-дегидрогеназы. Менадионредуктаза выявлялась пятью зонами ферментативной активности, диафораза — четырьмя, а NADH-дегидрогеназа — тремя (Hussendorfer et al., 1995). Было показано, что быстрая зона диафоразы (DIA-A) и вторая быстро мигрирующая зона менадионредуктазы (MNR-B) детерминируются одним и тем же геном (Dia-A или Mnr-B). Расположение и очертание трех медленных зон как у DIA, так и у MNR по данным немецких исследователей полностью совпадали со структурой и расположением зон NADH-дегидрогеназы (Hussendorfer et al., 1995).

Полиморфизм по локусу, кодирующему зону MNR-B или DIA-A, для представителей рода *Abies* также описан рядом авторов (Bergmann, Kownatzski, 1987; Fady, Conkle, 1992; Longauer, 1994). В работе Мейнартовича, посвященной изучению восточноевропейских популяций пихты белой, данный локус (обозначенный, как Men2) оказался мономорфным, хотя автор отмечает наличие трех аллелей по этому гену в популяциях пихты белой, произрастающих в западной части ее ареала (Mejnarowicz, 1996).

Пептидаза

Данный фермент выявлялся на электрофореграммах тремя основными зонами активности, при использовании в качестве субстратов дипептидов Leu-Tyr, Gly-Leu и трипептида Leu-Gly-Gly. Быстромигрирующая слабоокрашенная зона была идентична LAP-1. Проявление средней зоны зачастую носило непостоянный характер, и из дальнейших исследований она была исключена. Медленномигрирующая зона была представлена тремя электрофоретическими вариантами: PER^{0.90}, PER^{1.00} и PER^{1.05}. Анализ расщепления вариантов в гаплоидных тканях гетерозиготных образцов не показал достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1 (табл. 4), что указывает на аллельный характер их наследования. Отсутствие литературных данных по ген-ферментной системе пептидазы у *A. alba* не позволило провести сравнительный анализ полученных результатов с данными из других источников.

В целом, в ходе электрофоретического исследования 15 ген-ферментных систем в восточноевропейских популяциях *A. alba* удалось выявить 48 четко различающихся электрофоретических вариантов. В результате проведенного всестороннего генетического анализа было установлено, что 48 найденных вариантов у пихты белой нахо-

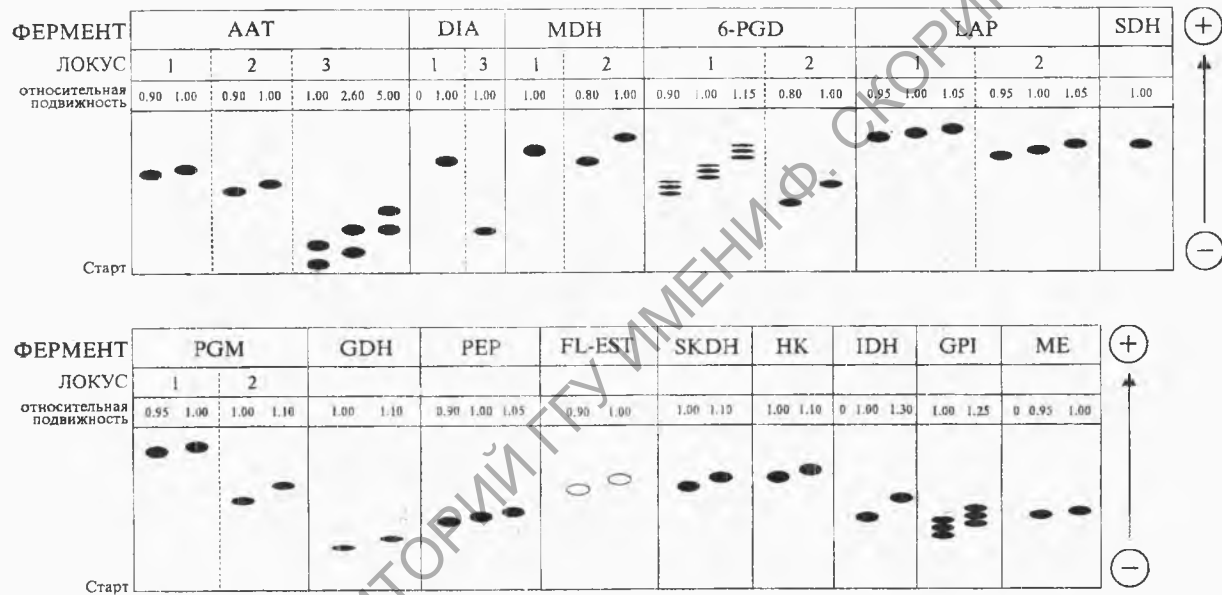


Рис. 12. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 22 локусов пихты белой в природных популяциях Восточной Европы

дятся под генетическим контролем 22-х независимых локусов. Все эти аллельные варианты и их относительная электрофоретическая подвижность наглядно изображены на рис. 12.

Подводя итог данной главы следует подчеркнуть, что 22 гена, кодирующих спектр ферментов из различных метаболических цепей, являются вполне надежной, хорошо функционирующей базой для решения широкого спектра задач, связанных с анализом популяционно-генетических ресурсов у пихты белой.

Ключевые слова и выражения

электрофоретическое разделение гистохимическое выявление фракции фермента анализ популяционно-генетических ресурсов. генетическая детерминация ферментные спектры. ферментные системы кодовый номер номенклатура ферментов гаплоидные эндоспермы диплоидные зародыши генотип дерева вероятность ошибки гетерозиготное дерево аллельный характер вариантов законы мейоза аллельные варианты фосфоглюкомутаза электрофореграмма зона активности фореграмма генетическая природа	электроморфы двухлокусный контроль экспрессия кодминантные аллели изоцитратдегидрогеназа нулевой вариант гомодимер гетеродимер полиморфизм аспартатаминотрансфераза лейцинаминопептидаза глюкозофосфатизомераза глутаматдегидрогеназа 6-фосфоглюконатдегидрогеназа малатдегидрогеназа флюоресцентная эстераза шикиматдегидрогеназа гексокиназа сорбитолдегидрогеназа малик-энзим диафораза пептидаза метаболические цепи
--	---

Вопросы и задачи к главе 3

1. Что такое электрофореграмма?
2. Что такое генетическая детерминация (как показать аллельный характер электрофоретических вариантов)?
3. Из электрофореграммы фосфоглюкомутазы (рис. 8) объяснить, сколько

и какие аллельные варианты у пихты белой (*A. alba*) имеются в локусе Pgm-1?

4. Сколько аллельных вариантов у пихты белой имеется на электрофореграмме изоцитратдегидрогеназы (рис. 9)?

5. Написать генотипы первых 10 диплоидных зародышей пихты белой по электрофореграмме изоцитратдегидрогеназы (рис. 9).

6. Написать генотипы диплоидных зародышей по электрофореграмме LAP-2 (рис. 10).

7. По электрофореграмме изоцитратдегидрогеназы (рис. 9) из 15 зародышей пихты белой рассчитать частоту встречаемости для аллельного варианта IDH^{1.00}.

8. То же самое рассчитать для аллельного варианта IDH^{1.30}.

9. Какие локусы у пихты белой кодируются наибольшим количеством аллелей (по схеме на рис. 12)?

Литература

1. Гончаренко Г. Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики/ Мн.: Техналогия, 1999. 188 с.
2. Гончаренко Г. Г., Падутов А. Е. Генетическая структура, таксономические и филогенетические взаимоотношения у пихт СНГ// Докл. АН России 1995. Т. 342. № 1. С. 122–126.
3. Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гос. ком. СССР по лесу. Гомель: Полеспечат, 1989. 164 с.
4. Номенклатура ферментов. М.: ВИНТИ, 1979. 320 с.
5. Bergmann F., Kownatzki D. The genetic variation pattern of silver fir (*Abies alba*) in Europe monitored from enzyme gene loci/ Paule L., Korpel S. (eds) 5. IUFRO-Tannensymposium, Zvolen: Hochschule für Forstwirtschaft und Holztechnologie. 1988. P. 21–26.
6. Breitenbach-Dorfer M., Pinsker W., Hacker R., Muller F. Clone identification and clinal allozyme variation in populations of *Abies alba* from the Eastern Alps (Austria)// Pl. Syst. Evol. 1992. V. 181. P. 109–120.
7. Fady B., Conkle M. T. Segregation and linkage of allozymes in seed tissues of the hybrid Greek fir *Abies borisii regis* Mattfeld// Silvae Genet. 1992. V. 41. P. 273–278.
8. Hussendorfer E., Konnerth M., Bergmann F. Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.)// Forest Genetics. 1995. V. 2. P. 29–40.
9. Jacobs B. F., Werth C. R., Guttman S. I. Genetic relationships in *Abies* (fir) of eastern United States: an electrophoretic study// Can. J. Bot. 1984. V. 62. P. 609–616.
10. Kormutak A., Yang J. C. The genetics and embryology of Taiwan Fir (*Abies kawakamii* (Hayata) Ito)// Taiwan J. For. Sci. Monograph 1. 1998. V. 13. 78 p.
11. Longauer R. Genetic differentiation and diversity of european silver fir in eastern part of its natural range// Proc. of the 7 IUFRO Westnannen-Sympos., Ökologie und Waldbau der Weissanne, 31.10– 3. 11. 1994. Altensteig. 1994. P. 155–163.
12. Mejnartowicz L. Cisovka — the relic population of *Abies alba* and its

relationship to man-made silver-fir stands in Bialowieza primeval forest// Acta Soc. Bot. Poloniae. 1996. V. 65. No. 3-4. P. 319-328.

13. **Mejnartowicz L., Lewandowski A., Bergmann F.** Genetic structure and variation of the European silver-fir populations at man-made range disjunction/ Proc. of the 7 IUFRO Tannensymposium der WP S.1.01-08, Ökologie und Waldbau der Weisstanne, 31. 10-3. 11. 1994. Altensteig. 1994. P. 118-127.

14. **Neale D. B., Adams W. T.** Inheritance of isozyme variants in seed tissues of balsam fir (*Abies balsamea*)// Can. J. Bot. V. 59. P. 1285-1291.

15. **Pascual L., Garcia F. J., Perfectti F.** Inheritance of isozyme variants in seed tissues of *Abies pinsapo* Boiss.// Sylv. Gen. 1993. V. 42. P. 285-376.

16. **Schroeder S.** Isozyme polymorphisms in silver fir (*Abies alba* Mill.)// Silvae Genet. 1989. V. 38. P. 130-133.

17. **Shea K. L.** Segregation of allozyme loci in megagametophytes of Engelmann spruce and subalpine fir// Genome. 1988. V. 30. P. 103-107.

Глава 4

Генетическая структура пихты белой в Беловежской пуще и других популяциях северо-восточной части ареала

Решение современных проблем лесовосстановления невозможно без знания **генофондов** лесообразующих пород, поскольку **состав генов (аллелей) и частоты их встречаемости** — это эволюционно сложившаяся структура, которая для природных популяций древесных видов формируется в течение тысячелетий. Именно **генетическая структура** определяет изменчивость и управляет адаптационными механизмами, позволяя каждой популяции приспособляться к условиям внешней среды.

В данной главе продемонстрированы этапы сравнительного анализа генетической структуры пихты белой в Беловежской пуще и шести других природных популяций северо-восточной части ареала этого вида.

Генетический анализ деревьев пихты белой в изолированной природной популяции Беловежской пущи

На первом этапе генетических исследований был проведен анализ всех 20 деревьев, составляющих природную популяцию пихты белой в Беловежской пуще. Расположение деревьев в пихтарнике представлено на рис. 2. Каждое дерево было проанализировано по 22 генам, кодирующим набор изоферментов, описанных в предыдущих главах. Установленные нами многолокусные генотипы (генетические портреты) всех деревьев этого уникального насаждения приведены в табл. 5. Из таблицы хорошо видно, что у деревьев *A. alba* в Беловежской пуще генетическая изменчивость была обнаружена только по восьми локусам (*Idh*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Mdh-2*, *6-Pgd-1*, *Pgm-1*, *Pgm-2* и *Me*), в то время как остальные гены оказались мономорфными.

Количество гетерозиготных локусов для каждого дерева в Тисовике колебалось от 1 до 6 (табл. 5). Причем 6, 5 и 4 гетерозиготных локусов было встречено только по одному разу у пихт №1, №3 и №17,

соответственно. Четыре дерева в насаждении оказались гетерозиготными по одному гену. Более половины деревьев *A. alba* в природной популяции Беловежской пуши несли в гетерозиготном состоянии по три локуса (табл. 5). В целом, каждое дерево оказалось в среднем гетерозиготным по 2,8 генам или по 12% от исследованных. Наличие восьми полиморфных локусов при гетерозиготности каждого дерева по 12% своих генов однозначно свидетельствует о том, что данное насаждение, несмотря на крайне ограниченные размеры и количество деревьев, не подвергалось действию жесткого инбридинга.

Необходимо отметить еще один результат генетического анализа насаждения пихты белой в Беловежской пуше. Оказалось, что 17 из 20 деревьев *A. alba* в Тисовике имеют собственный индивидуальный генотип (табл. 5). Иными словами, каждое из 17 деревьев по своим наследственным характеристикам отличаются от других. В то же время, еще у трех деревьев №12, №16 и №18 генотипы оказались идентичными, хотя и отличались от остальных семнадцати.

Набор из 22 использованных генов является достаточно репрезентативным, тем не менее, не исключено, что при вовлечении в анализ большего количества локусов могут появиться такие, по которым у трех идентичных деревьев выявятся какие-либо генетические различия. В любом случае нельзя исключить и вариант, при котором три идентичных пихты являются потомками одного родительского дерева. Если имеет место последний вариант, а это вполне вероятно, то тогда существующая в настоящее время популяция пихты в Тисовике сформировалась при определенном влиянии эффекта основателя, что нельзя рассматривать как благоприятную тенденцию для дальнейшего полноценного существования этой изолированной популяции в долговременной перспективе.

Хотелось бы подчеркнуть, что генетический анализ с использованием изоферментов позволил осуществить генетическую паспортизацию (дактилоскопию) всех деревьев пихты белой в природном насаждении Беловежской пуши. Электрофоретический фрагмент генетических паспортов всех 20 деревьев *A. alba* из урочища "Тисовик" представлен на рисунке 13. В результате генетической паспортизации удалось выявить наиболее ценные деревья в насаждении. В первую очередь к ним необходимо отнести пихты №1, №3 и №17, несущие в себе наибольшее аллельное разнообразие. Так, в случае гибели, например, дерева №1 произойдет полная потеря аллеля $Mdh-2^{080}$, сни-

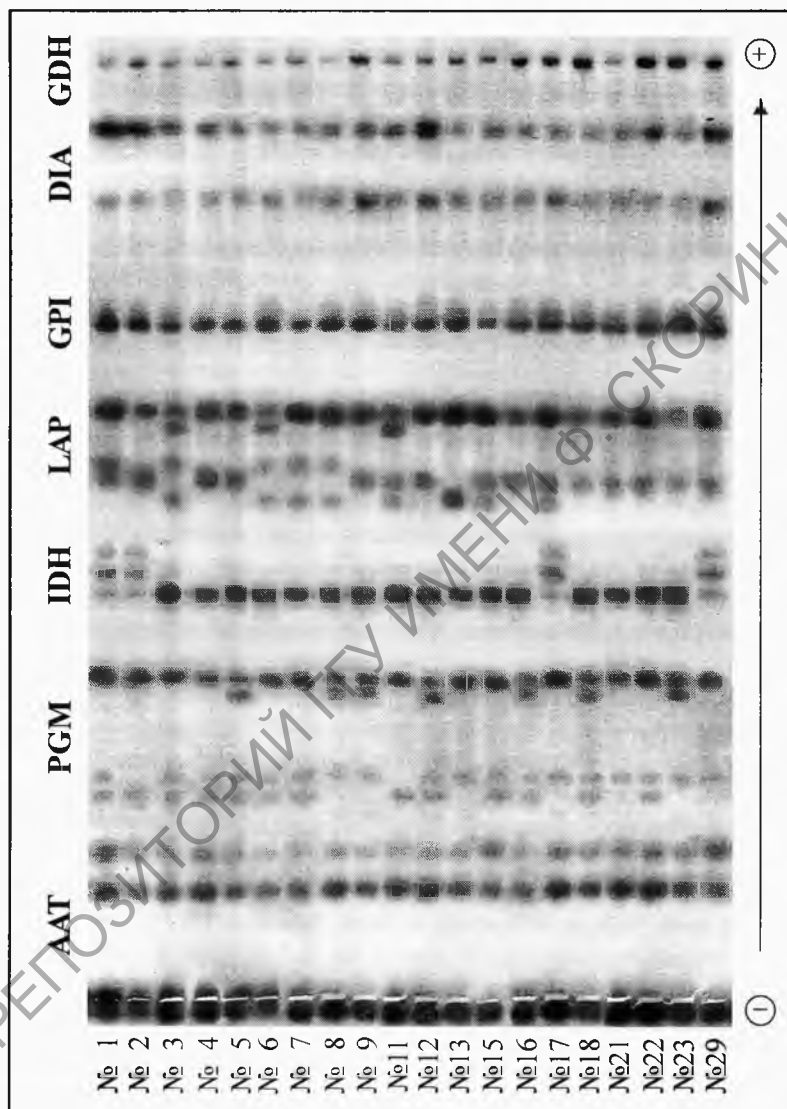


Рис. 13. Электрофоретический спектр 20 деревьев пихты белой из Беловежской пуши по ряду локусов, ответственных за синтез различных ферментных систем

зятся параметры генетического разнообразия и существенно изменится генетическая структура всей природной популяции *A. alba* в Беловежской пушке. Кроме того, будет нанесен невосполнимый ущерб следующему поколению, поскольку в потомстве от 20 деревьев в Тисовике, проанализированных по 8 полиморфным локусам, из которых 7 являются диаллельными, а 1 трехаллельным (табл. 5), в семенном потомстве возможны $(3^7 \times 6^1)$ 13122 потомка с различными генотипами (см. Гончаренко и др., 1989). При потере одного аллеля (например, $Mdh-2^{080}$) число потомков с разными генетическими портретами сразу сократится $(3^6 \times 6^1)$ более чем на 8 тысяч — до 4374. Такова в нашем случае цена потери даже одного аллеля. Из всего вышеизложенного, даже без математических расчетов становится очевидным, что при утрате каждого следующего аллеля ситуация в семенном потомстве пихты белой в Беловежской пушке будет еще более усугубляться.

Подводя итог, следует сказать, что проведенные генетические исследования впервые дают возможность целенаправленного, полномасштабного воспроизводства генофонда данной популяции как на территории Тисовика, так и за его пределами, поскольку позволяют контролировать генетический состав семенной продукции, семян и другого посадочного материала на любых этапах лесовосстановительного процесса. Генетический контроль приобретает особую актуальность в последнее время в связи с тем, что уникальное насаждение пихты белой в Беловежской пушке вызывает интерес в плане воссоздания европейских равнинных смешанных лесов богатого породного состава, произраставших ранее на территории стран Восточной и Центральной Европы, с участием *A. alba*. Успех восстановления равнинных пихтовых насаждений напрямую зависит от полноценности использованного генетического материала, так как потеря генотипа даже одного дерева существенно снижает популяционно-генетические ресурсы воссоздаваемого пихтового насаждения.

Сравнительный анализ генетической структуры пихты белой в Беловежской пушке и других природных популяций северо-восточной части ареала этого вида

Как уже отмечалось на страницах данного пособия, *A. alba* в Беловежской пушке удалена более чем на сто километров от границы основного ареала и ведет самостоятельное существование в течение,

по крайней мере, нескольких поколений. В связи с ее изоляцией, а также принимая во внимание важность данной популяции в плане сохранения и воссоздания европейских равнинных лесов, представляло существенный интерес **выяснить** — **отличается ли генетическая структура пушанского насаждения пихты белой от других близкорасположенных популяций этого вида.**

Для сравнительного популяционно-генетического анализа был использован материал шести природных популяций *A. alba*, расположенных в северо-восточной части ареала данного вида. Три природные популяции произрастают в Украинских Карпатах на территории Дрогобычского лесхоза (Дрогобыч), Делятинского лесокombината (Делятин) и Ворохтянского лесокombината (Ворохта). Остальные три — в Юго-Восточной Польше на территории Лукувского лесного района в резервате Ята (Ята), Найовского лесного района в резервате Лабовец (Лабовец) и Национального парка “Росточье” (Росточье). Месторасположение всех семи исследованных популяций *A. alba* показано на рис. 14.

Электрофоретический анализ материала 220 деревьев из семи природных популяций *A. alba* проводился по 15 ген-ферментным системам, которые, как было показано в предыдущих главах, находятся под контролем 22 генов. Название ферментов, код, предпочитаемая для анализа буферная система и количество используемых локусов приведены в табл. 3.

Для оценки генетической структуры были рассчитаны частоты встречаемости аллелей в каждой из семи исследованных восточноевропейских популяций и у *A. alba* в целом. Все 48, обнаруженных у пихты белой, аллельных вариантов и их относительная электрофоретическая подвижность схематически изображены на рис. 12 (стр. 45). Аллельные частоты, а также показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности по всем проанализированным генам представлены в табл. 6. Из таблицы хорошо видно, что в большинстве восточноевропейских популяций *A. alba* практически в каждом локусе преобладает аллель 1.00. Этот факт указывает на сходство генетических структур исследованных популяций, несмотря на определенную отдаленность и изолированность некоторых из них. В то же время по таким локусам, как *Idh*, *6-Pgd-1* и *Pgm-2* в трех популяциях преобладают другие аллели (табл. 6). Причем, в популяциях Ворохта и Беловежская пуща аллели, отличающиеся от 1.00, преобладают в 2-х локусах (*Idh*,



Рис. 14. Восточноевропейская часть ареала *A. alba* (по Маценко, 1964; Lui, 1971) с указанием мест произрастания исследованных популяций: 1 — Беловежская пуша, 2 — Дрогобыч, 3 — Делятин, 4 — Ворохта, 5 — Ята, 6 — Лабовец, 7 — Ростоцье

6-Pgd-1 и 6-Pgd-1, Pgm-2 соответственно), а в популяции Делятин — только в одном (Idh).

Необходимо подчеркнуть, что наибольшие отличия в генетической структуре характерны для популяции Беловежская пуша, поскольку кроме двух уже отмеченных локусов (6-Pgd-1 и Pgm-2) у нее имеются серьезные отличия от остальных популяций еще и по локусам Pgm-1 и Idh (табл. 6). В локусе, кодирующем изоцитратдегидрогеназу, концентрация аллеля 1.30 в Беловежской пуше составляет только 10%, тогда как в остальных восточноевропейских популяциях частота этого аллеля колеблется от 40 до 83%. По Pgm-1 различия на первый взгляд кажутся не столь существенными, тем не менее аллель 0.95, который в Тисовике достигает 17.5%, в четырех других проанализированных популяциях полностью отсутствует, а еще в двух встречается с частотой всего лишь 2% (табл. 6). Вряд ли условия в Беловежской пуше для *A. alba* настолько отличаются от других исследованных насаждений, что разницу в аллельных частотах между ней и остальными шестью популяциями можно объяснить различием в действии естественного

Таблица 6. Аллельные частоты и значения гетерозиготностей по 22 локусам у *Abies alba* в природных популяциях Восточноевропейского региона

Локус, аллели	Популяции							<i>A. alba</i>
	Бп	Др	Дл	Вр	Ят	Ро	Лб	
Idh								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0	.0	.0	.0	.0	.010	0	0	.002
1.00	.900	.597	.400	.167	.570	.500	.533	.536
1.30	.100	.403	.600	.833	.420	.500	.467	.462
H _o	.200	.361	.720	.333	.380	.440	.587	.445
H _e	.180	.481	.480	.278	.499	.500	.498	.449
Skdh								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.989	.998
1.10	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.011	.002
H _o	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.022	.005
H _e	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.022	.005
6-Pgd-1								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0.90	.0	.014	.0	.0	.0	.0	.0	.002
1.00	.400	.569	.620	.417	.690	.520	.587	.573
1.15	.600	.417	.380	.583	.310	.480	.413	.425
H _o	.600	.611	.760	.722	.380	.480	.609	.568
H _e	.480	.502	.471	.486	.428	.499	.485	.491
6-Pgd-2								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0.80	.0	.042	.020	.083	.060	.0	.033	.036
1.00	1.0	.958	.980	.917	.940	1.0	.967	.964
H _o	.0	.083	.040	.167	.120	.0	.065	.073
H _e	.0	.080	.039	.152	.113	.0	.064	.070
Gdh								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	1.0	1.0	1.0	.944	1.0	1.0	1.0	.995
1.10	.0	.0	.0	.056	.0	.0	.0	.005
H _o	.0	.0	.0	.111	.0	.0	.0	.009
H _e	.0	.0	.0	.106	.0	.0	.0	.009
Aat-1								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0.90	.0	.028	.0	.0	.0	.0	.0	.005
1.00	1.0	.972	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.995
H _o	.0	.056	.0	.0	.0	.0	.0	.009
H _e	.0	.054	.0	.0	.0	.0	.0	.009

Продолжение табл. 6

Локус, аллели	Популяции							
	Бп	Др	Дл	Вр	Ят	Ро	Лб	<i>A. alba</i>
Aat-2								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0.90	.0	.0	.0	.0	.020	.020	.011	.009
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	.980	.980	.989	.991
H _o	.0	.0	.0	.0	.040	.040	.022	.018
H _e	.0	.0	.0	.0	.039	.039	.022	.018
Aat-3								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	1.0	.819	.920	1.0	.950	.860	.848	.903
2.60	.0	.181	.080	.0	.040	.140	.152	.095
5.00	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.002
H _o	.0	.139	.160	.0	.100	.200	.304	.150
H _e	.0	.296	.147	.0	.096	.241	.258	.177
Dia-1								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0	.0	.0	.0	.028	.030	.040	.0	.014
1.00	1.0	1.0	1.0	.972	.970	.960	1.0	.986
H _o	.0	.0	.0	.056	.060	.080	.0	.027
H _e	.0	.0	.0	.054	.058	.077	.0	.027
Dia-3								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H _o	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
H _e	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
Lap-1								
n	20	36	25	18	32	25	33	189
0.95	.075	.069	.080	.056	.0	.0	.121	.058
1.00	.925	.917	.880	.888	.969	.980	.818	.910
1.05	.0	.014	.040	.056	.031	.020	.061	.032
H _o	.150	.111	.160	.222	.063	.040	.364	.159
H _e	.139	.154	.218	.205	.060	.039	.313	.167
Lap-2								
n	20	36	25	18	32	25	23	179
0.95	.200	.097	.280	.167	.104	.140	.261	.169
1.00	.700	.778	.600	.750	.688	.760	.630	.704
1.05	.100	.125	.120	.083	.208	.100	.109	.127
H _o	.400	.417	.560	.500	.406	.480	.522	.464
H _e	.460	.370	.547	.403	.473	.393	.523	.460

Продолжение табл. 6

Локус, аллели	Популяции							
	Бп	Др	Дл	Вр	Ят	Ро	Лб	<i>A. alba</i>
Pgm-1								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0.95	.175	.0	.0	.0	.020	.0	.022	.025
1.00	.825	1.0	1.0	1.0	.980	1.0	.978	.975
H _o	.350	.0	.0	.0	.040	.0	.043	.050
H _e	.289	.0	.0	.0	.039	.0	.043	.049
Pgm-2								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	.375	.903	.880	.944	.990	.880	.826	.857
1.10	.625	.097	.120	.056	.010	.120	.174	.143
H _o	.550	.194	.240	.111	.020	.160	.348	.214
H _e	.469	.175	.211	.106	.020	.211	.287	.245
Hk								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	1.0	.986	1.0	1.0	.970	1.0	.967	.984
1.10	.0	.014	.0	.0	.030	.0	.033	.016
H _o	.0	.028	.0	.0	.060	.0	.065	.032
H _e	.0	.028	.0	.0	.058	.0	.064	.032
Sdh								
n	20	36	25	18	15	15	15	144
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H _o	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
H _e	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
Me								
n	20	36	25	18	42	25	9	175
0	.0	.014	.020	.0	.0	.0	.167	.014
0.95	.250	.181	.380	.306	.131	.300	.278	.240
1.00	.750	.805	.600	.694	.869	.700	.555	.746
H _o	.500	.333	.800	.611	.214	.600	.889	.486
H _e	.375	.319	.495	.425	.228	.420	.587	.386
Fl-Est								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
0.90	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.013	.003
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	.987	.997
H _o	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.022	.005
H _e	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.026	.005
Mdh-1								
n	20	36	25	18	40	25	38	202
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H _o	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
H _e	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0

Продолжение табл. 6

Локус, аллели	Популяции							
	Бп	Др	Дл	Вр	Ят	Ро	Лб	<i>A. alba</i>
Mdh-2								
n	20	36	25	18	40	25	38	202
0.80	.025	.0	.0	.083	.013	.0	.0	.012
1.00	.975	1.0	1.0	.917	.987	1.0	1.0	.988
H_o	.050	.0	.0	.167	.025	.0	.0	.025
H_e	.049	.0	.0	.152	.026	.0	.0	.025
Gpi								
n	20	36	25	18	50	25	46	220
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	.990	1.0	1.0	.998
1.25	.0	.0	.0	.0	.010	.0	.0	.002
H_o	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.005
H_e	.0	.0	.0	.0	.020	.0	.0	.005
Per								
n	20	10	9	13	47	25	43	167
0.90	.0	.100	.056	.154	.021	.030	.023	.037
1.00	1.0	.900	.833	.769	.979	.970	.977	.951
1.05	.0	.0	.111	.077	.0	.0	.0	.012
H_o	.0	.200	.333	.462	.043	.120	.047	.108
H_e	.0	.180	.291	.379	.041	.058	.045	.095

Примечание. Бп — Беловежская пуца, Др — Дрогобыч, Дл — Делятин, Вр — Ворохта, Ят — Ята, Лб — Лабовец, Ро — Росточье; n — количество проанализированных деревьев; H_o — значение наблюдаемой гетерозиготности; H_e — значение ожидаемой гетерозиготности.

отбора. Скорее всего сохранившаяся природная популяция пихты белой в Беловежской пуце представляет собой потомство от небольшого количества деревьев, вследствие чего и произошел сдвиг в аллельных частотах. Иными словами, существующее в настоящее время насаждение *A. alba* в Тисовике, вероятней всего, сформировалась под определенным влиянием эффекта основателя.

Наиболее изменчивыми в проанализированных восточноевропейских популяциях оказались 5 локусов: Idh, 6-Pgd-1, Lap-2, Pgm-2 и Me, поскольку их средняя ожидаемая гетерозиготность у *A. alba* в целом превышала 30% (табл. 6). По четырем локусам (6-Pgd-2, Aat-3, Lap-1 и Per) значение ожидаемой гетерозиготности колеблется от 5

до 20%, что позволяет отнести их к локусам со средним уровнем полиморфизма. Наименее изменчивыми являются *Skdh*, *Gdh*, *Aat-1*, *Aat-2*, *Dia-1*, *Pgm-1*, *Hk*, *Fl-Est*, *Mdh-2* и *Gpi*, так как их средняя гетерозиготность не превышает 5%. Причем у *Skdh*, *Gdh*, *Aat-1*, *Fl-Est* и *Gpi* изменчивость обнаружена только в какой-либо одной популяции. Мономорфными во всех семи исследованных популяциях оказались локусы *Dia-3*, *Sdh* и *Mdh-1* (табл. 6).

Нельзя не отметить тот факт, что наибольшее количество полиморфных локусов (15) было обнаружено в польской популяции Ята, тогда как наименьшее (8) оказалось в Беловежской пушце (табл. 6).

Обращает на себя внимание довольно большое количество редких и уникальных аллелей, которые встретились в проанализированных популяциях пихты белой практически в каждом полиморфном локусе. Из 48 найденных аллелей у *A. alba* 9 оказались редкими, так как их частота для вида в целом была менее 1%. При этом, 8 из числа редких аллелей встретились только в одной какой-либо популяции, т.е. являлись уникальными ("частными"). Анализ характера распределения уникальных аллелей не выявил каких-либо различий между регионами, так как 3 аллеля были обнаружены в двух украинских популяциях — Дрогобыч и Ворохта, в то время как остальные 5 распределились по двум польским популяциям — Ята и Лабовец (табл. 6). Как и следовало ожидать, в насаждении Беловежская пушца отсутствовали как редкие, так и уникальные аллели. Факт отсутствия в белорусской популяции редких и уникальных аллелей вкпе с наименьшим среди проанализированных популяций количеством полиморфных генов указывает на неблагоприятные тенденции, развивающиеся в этой популяции. И хотя явных генетических признаков инбридинга не наблюдается, тем не менее дальнейшая потеря даже минимального количества генотипов или аллелей с большой вероятностью может привести к инбридингу с последующей деградацией изолированной, автохтонной популяции в Тисовике.

Имеется еще одно исследование, посвященное генетическому анализу природной популяции пихты белой в Беловежской пушце. В работе польского исследователя Мейнартовича был проанализирован материал 11 деревьев из Тисовика с использованием 17 аллозимных локусов (Mejnartowicz, 1996). В результате проведенного анализа изменчивость была обнаружена только по 5 локусам (*Gdh*, *Pgm-2*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Est-3*). Сопоставление результатов этого исследования с

данными белорусских ученых, представленными в таблице 5 и рисунке 13, (Гончаренко, Савицкий, 2000) показало, что анализ 11 деревьев не позволил выявить все аллельное разнообразие, присущее данной популяции. Так, например, среди 11 деревьев не оказалось ни одного гетерозиготного по локусам *Pgm-1* и *Idh-2* (гомологичен *Idh* в данном пособии), а также удалось обнаружить только 2 аллеля в локусе *Lap-2* (Mejnartowicz, 1996). В то же время, в ходе исследования белорусскими генетиками всех 20 деревьев по локусу *Pgm-1* гетерозиготными оказались сразу семь деревьев и по *Idh* – четыре (табл. 5, рис. 13). Причем, концентрация альтернативных аллелей *Pgm-1*⁰⁹⁵ и *Idh*¹³⁰ достигла 17.5 и 10% соответственно (табл. 6). Кроме того, по локусу *Lap-2* было выявлено три аллеля.

Все вышесказанное наглядно иллюстрирует, что использование только части деревьев не позволит полноценно воспроизвести генофонд популяции Тисовика, в результате чего шансы на успешную адаптацию вновь создаваемого насаждения будут резко снижены.

Оценивая генетическую структуру *A. alba* в исследованных природных популяциях, следует сказать, что в целом пихта белая в восточноевропейской части своего ареала характеризуется относительно не богатым аллельным разнообразием, поскольку из 22 проанализированных ни по одному локусу количество аллелей не достигало четырех и лишь в 5 локусах было выявлено по три аллеля (табл. 6). У других хвойных, таких как *Pinus sylvestris* L., *Pinus mugo* Turra и *Picea abies*, также произрастающих в восточноевропейском регионе, количество локусов с четырьмя и более аллелями для каждого вида превышало цифру 9 (Гончаренко, Потенко, 1991; Goncharenko et al., 1994; 1995; Гончаренко, 1999). Еще одной интересной особенностью, характеризующей генетическую структуру *A. alba* в восточноевропейском регионе, является малое количество нулевых аллелей, найденных только в трех локусах (табл. 6), тогда как у *P. mugo*, *P. sylvestris* и *P. abies* они присутствуют в 7, 15 и 10 проанализированных локусах соответственно (Гончаренко, 1999).

Ключевые слова и выражения

генофонд состав генов (аллелей) частоты встречаемости аллелей генетическая структура	жесткий инбридинг индивидуальный генотип эффект основателя генетическая паспортизация
---	--

дактилоскопия генетически ценные деревья параметры генетического разнообразия воспроизводство генофонда- контроль генетического состава генетический материал сдвиг в аллельных частотах	наиболее изменчивые локусы наименее изменчивые локусы мономорфные локусы редкие аллели уникальные аллели неблагоприятные генетические тенденции в популяции аллельное разнообразие
--	---

Вопросы и задачи к главе 4

- Исходя из электрофоретического спектра на рис. 13 записать генотипы 20 деревьев пихты белой по локусу *Idh* (проверить себя по таблице 5).
- Из данных рис. 13 написать генотипы 20 деревьев по локусу *Lap-1* (сверить с табл. 5).
- То же самое по локусу *Lap-2* (сверить с табл. 5).
- То же самое по *Pgm-1* (сверить с табл. 5).
- То же самое по *Pgm-2* (сверить с табл. 5).
- По данным табл. 5 указать наиболее генетически ценные деревья *A. alba* в Беловежской пуше.
- Указать генетически наименее ценные деревья пихты белой в Беловежской пуше.
- Используя рис. 13 подсчитать аллельные частоты по локусу *Lap-1*: а) для первых 10-ти деревьев пихты белой; б) для всех 20 деревьев (сверить с табл. 6).
- То же самое для аллелей локуса *Idh* (сверить с табл. 6).
- То же самое для аллелей *Pgm-1* (сверить с табл. 6).
- Сколько потомков с различными генотипами можно получить от свободного скрещивания 20 деревьев пихты белой в Беловежской пуше, если они полиморфны по 8 локусам (7 диаллельных, 1 трехаллельный)?
- На сколько снизится число потомков с различными генотипами, если в природном пихтовом насаждении Беловежской пуши произойдет потеря одного аллеля (например, $Mdh^{0.80}$)?
- Предположим, что распределение генотипов по локусу *Idh* среди 35 деревьев (по данным 1967 года) пихты белой в Тисовике было следующим: 8 деревьев имели генотип $Idh^{1.00/1.30}$, а остальные $Idh^{1.00/1.00}$. Каковы в этом случае были аллельные частоты по данному локусу?
- В польской популяции, расположенной на территории Национального парка "Росточье", по локусу *Idh* проанализировано 25 деревьев, из которых 7 были гомозиготны по аллелю 1.00, еще 7 гомозиготны по аллелю 1.30,

остальные оказались гетерозиготными. Рассчитайте частоты аллелей по данному локусу в этой популяции.

15. Используя условие задачи 14, рассчитайте значение фактически наблюдаемой гетерозиготности, а также значение ожидаемой гетерозиготности, исходя из соотношения Харди-Вайнберга для популяции Ростоцье.

16. В шести из семи исследованных восточно-европейских популяциях пихты белой локус *Gdh* оказался мономорфным и только в украинской популяции Ворохта среди 18 проанализированных деревьев в одном случае был обнаружен второй аллель *Gdh*^{1,10}. Является ли этот аллель уникальным? Можно ли считать этот аллель редким для данной популяции? Является ли он редким для восточноевропейских популяций, если в них было проанализировано 220 деревьев?

17. Если провести электрофоретический анализ материала 10 деревьев пихты белой, взятых случайным образом из популяции в Беловежской пуще, то какова вероятность того, что среди них не окажется ни одного гетерозиготного по локусу *Pgm-1* или *Idh*?

Литература

1. Маценко А. Е. Пихты восточного полушария/ Флора и систематика высших растений. Вып. 13. (Труды Ботанического института имени В. Л. Комарова. Серия I). М., Л.: Наука, 1964. С. 3–103.
2. Гончаренко Г. Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики/ Мн.: Техналогія, 1999. 188 с.
3. Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гос. ком. СССР по лесу. Гомель: Полеспечать, 1989. 164 с.
4. Гончаренко Г. Г., Потенко В. В. Параметры генетической изменчивости и дифференциации в популяциях ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.)// Генетика. 1991. Т. 27. № 10. С. 1759–1772.
5. Гончаренко Г. Г., Савицкий Б. П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2000. 122 с.
6. Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E. Allozyme variation in natural populations of Eurasian pines. III. Population structure, diversity, differentiation and gene flow in central and isolated populations of *Pinus sylvestris* L. in Eastern Europe and Siberia// Silvae Genet. 1994. V. 43. P. 119–132.
7. Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E. Intra- and interspecific genetic differentiation in closely related pines from *Pinus* subsection *Sylvestres* (Pinaceae) in the former Soviet Union// Pl. Syst. Evol. 1995. V. 194. P. 39–54.
8. Mejnartowicz L. Cisovka — the relic population of *Abies alba* and its relationship to man-made silver-fir stands in Bialowieza primeval forest// Acta Soc. Bot. Poloniae. 1996. V. 65. No. 3–4. P. 319–328.
9. Liu T. S. A Monograph of Genus *Abies*. Taipei, Taiwan, 1971. 608 p.

Глава 5

Уровень генетической изменчивости у пихты белой в природных популяциях северо-восточной части ареала

В процессе развития популяционной генетики, благодаря усилиям нескольких поколений ученых, как уже отмечалось в предыдущих главах, были разработаны четкие параметры, которые на основе электрофоретических данных позволяют количественно определять уровень генетической изменчивости в популяциях и, тем самым, дают возможность оценить состояние популяционно-генетических ресурсов каждого насаждения.

Для определения уровня генетической изменчивости у *A. alba* в насаждении Беловежская пуца и 6 других природных популяций северо-восточной части ареала были рассчитаны значения основных параметров полиморфизма по 22 генам. Величины этих показателей для семи восточноевропейских популяций пихты белой представлены в табл. 7.

Как видно из таблицы 7 показатель P_{99} — доля полиморфных локусов по 99%-ному критерию в проанализированных популяциях Восточной Европы колеблется в пределах от 0.364 в белорусской популяции Беловежская пуца, до 0.682 в польской популяции из лесного резервата Ята. Значения параметра, определяющего среднее число нередких аллелей на локус ($A_{1\%}$) варьирует от 1.409 (Беловежская пуца) до 1.773 (Лабовец). Один из наиболее важных показателей генетической изменчивости, средняя ожидаемая гетерозиготность (H_e) находится в пределах от 0.100 в Яте, до 0.147 в Лабовце. Довольно существенные различия между популяциями обнаружены по наблюдаемой гетерозиготности. Так, в предгорной польской популяции Ята H_o составила только 0.090, тогда как в другой польской популяции Лабовец, произрастающей в Бескидских горах H_o имело значение почти в 2 раза выше — 0.178 (табл. 7).

Необходимо отметить, что среди исследованных популяций

Таблица 7. Значения основных показателей генетического полиморфизма в природных популяциях *A. alba* в северо-восточной части ареала

Популяции	Доля полиморфных локусов		Среднее число аллелей на локус		Средняя гетерозиготность	
	P_{95}	P_{99}	A	$A_{1\%}$	H_c	H_o
Беловежская пушча	.318	.364	1.409	1.409	.111	.127
Дрогобыч	.364	.500	1.682	1.682	.120	.115
Делятин	.364	.409	1.591	1.591	.132	.172
Ворохта	.455	.500	1.636	1.636	.125	.157
Ята	.273	.682	1.818	1.636	.100	.090
Росточье	.273	.455	1.500	1.500	.113	.120
Лабовец	.318	.636	1.773	1.773	.147	.178
В целом по виду	.318	.591	2.182	1.773	.126	.130

A. alba наиболее богатыми популяционно-генетическими ресурсами обладает польское горное насаждение Лабовец, поскольку у него оказались самые высокие значения по 3 показателям полиморфизма, а еще по одному — среднему числу всех аллелей на локус оно уступает только насаждению Ята (табл. 7). В то же время, как следует из данных таблицы, наименее богатое генетическое разнообразие присуще насаждению Беловежская пушча. В этой популяции оказались самые низкие значения по 3 важным параметрам генетической изменчивости — P_{99} , A и $A_{1\%}$. Кроме того, вместе с популяцией Ята, Беловежская пушча имеет самые низкие значения и по наиболее точному показателю генетического полиморфизма, такому как средняя ожидаемая гетерозиготность.

Тот факт, что пихта в Беловежской пушче имеет наиболее бедные популяционно-генетические ресурсы исходя из значений 4 параметров генетического полиморфизма не является неожиданным. Не меняет ситуацию относительное благополучие с показателем H_o , по которому пушчанское насаждение не относится к самым низко изменчивым, поскольку популяция в Беловежской пушче при 20 сохранившихся деревьях настолько уязвима, что достаточно потерять даже одно дерево и положение может сразу измениться. Так, если выпадет какое-либо из генетически богатых деревьев, например, дерево №1 (см. главу 4), то значение наблюдаемой гетерозиготности сразу

станет меньше 12% и по этому показателю популяция в Тисовике также попадет в разряд наименее изменчивых. При этом снизятся и все другие параметры генетического разнообразия, которые и так имеют самые низкие значения.

Несмотря на все вышесказанное, полученные результаты, касающиеся параметров генетической изменчивости, дают объективные основания однозначно утверждать, что насаждение в Тисовике еще не подвергалось действию жесткого инбридинга и в настоящее время располагает достаточным генофондом для успешного воспроизведения данной популяции как на территории Беловежской пуши, так и за ее пределами. В то же время, как уже отмечалось ранее, для полномасштабного воспроизводства этой популяции необходимо использовать весь генетический материал, сохранившийся в насаждении.

В целом, в результате проведенного анализа генетической изменчивости у пихты белой следует сказать, что в популяциях северо-восточной части ареала этого вида более 59% локусов находятся в полиморфном состоянии, количество аллелей на локус превышает 2.18, а каждое дерево является гетерозиготным, в среднем по 12.6%, своих генов. При этом, насаждения *A. alba* в данной части ее ареала находятся практически в состоянии равновесия по Харди-Вайнбергу, так как разница между средней ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготностью составляет всего 0.4% (табл. 7).

Интересно отметить, что у других хвойных — сосны обыкновенной, сосны горной и ели европейской, также входящих в состав лесов Восточной Европы, значения показателей генетического полиморфизма были существенно выше чем у пихты белой, так как процент полиморфных локусов для всех трех видов превышал 75% и каждое дерево елей было гетерозиготно, в среднем, более чем по 18,5% своих генов, а сосен, более чем по 27% (Гончаренко, Потенко, 1990; 1991a; Гончаренко и др. 1994; Goncharenko et al., 1994, 1995b; Гончаренко, Силин, 1997). Все это отчасти свидетельствует о более бедном генетическом потенциале пихты белой по сравнению с восточноевропейскими елями и двухвойными соснами.

В то же время, более интересно было сравнить популяционно-генетические ресурсы пихты белой по показателям генетического полиморфизма с другими видами пихт.

За истекшие годы появилось несколько публикаций, посвященных изучению генетической изменчивости у представителей рода *Abies*, большинство из которых произрастает на территории Евразии (Neale, Adams, 1981; Jacobs et al., 1984; Longauer, 1994; Гончаренко, Падутов, 1995; Mejnartowicz, 1996; Nagasaka et al., 1997; Goncharenko et al., 1998 a,b; Kormutak, Yang, 1998; Гончаренко, Савицкий, 2000). В табл. 8 приведена сводка основных показателей генетичес-

кого полиморфизма у 8 видов пихт. Принято считать, что подробную информацию об уровне генетической изменчивости вида можно получить в том случае, если по каждому гену исследовано по крайней мере 25 случайно взятых из популяции индивидуумов (деревьев). Причем, гены должны выбираться также случайным образом, и их количество не должно быть менее 14–18 (Левонтин, 1978; Nevo et al., 1984). По мнению Айалы (1984), наиболее точная оценка генетической изменчивости достигается при анализе 20 и более генов. Однако, в связи с тем, что популяционно-генетических исследований по пихтам проведено очень мало, в сводку включены и те работы, где использовалось менее 14 генов. В табл. 8 для *A. alba* по показателю ожидаемой гетерозиготности приведено усредненное значение, поскольку в представленную таблицу были включены данные нескольких исследований. Необходимо отметить, что в одной из работ (Longauer, 1994), где средняя ожидаемая гетерозиготность варьировала в разных регионах от 0.145 до 0.211, значения данного показателя рассчитывались только на основании полиморфных локусов, в результате чего величина параметра H_e в этом исследовании может быть несколько завышенной. Что касается видов *A. nordmanniana*, *A. semenovii*, *A. sibirica*, *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* (Fr. Schmidt) Mast., то для данной таблицы значения показателей генетической изменчивости были рассчитаны на основании тех же 22 локусов, которые использованы в работе при анализе *A. alba*.

Из табл. 8 видно, что представители рода *Abies* в целом обладают относительно высокой генетической изменчивостью. Более 50% локусов у них находятся в полиморфном состоянии, а каждое дерево гетерозиготно в среднем по 15.4% своих генов.

Основной показатель, наиболее точно определяющий генетическую изменчивость, — ожидаемая гетерозиготность (H_e) — в природных популяциях

Таблица 8. Значения основных показателей генетического полиморфизма представителей рода *Abies*

Виды	Доля полиморфных локусов	Средняя гетерозиготность		Литературные источники (см. примечание к табл.)
		наблюдаемая	ожидаемая*	
<i>A. alba</i>	0.373–0.591	0.129–0.175	0.126–0.177 (0.145)	[2, 3, Наши данные]
<i>A. balsamea</i>	0.600	0.266	0.274	[1, 4]
<i>A. fraseri</i>	0.500	—	—	[1]
<i>A. nordmanniana</i>	0.591	0.102	0.106	[Наши данные]
<i>A. sachalinensis</i>	0.818	0.206	0.205	[Наши данные]
<i>A. nephrolepis</i>	0.500	0.213	0.204	[Наши данные]
<i>A. sibirica</i>	0.500	0.108	0.129	[Наши данные]
<i>A. semenovii</i>	0.091	0.016	0.015	[Наши данные]
Среднее			0.154	

Примечание. 1 — Jacobs et al., 1984; 2 — Longauer, 1994; 3 — Mejnartowicz, 1996; 4 — Neale, Adams, 1981

* В скобках указана усредненная величина ожидаемой гетерозиготности для вида в целом.

таких видов как *A. nephrolepis*, *A. sachalinensis* и *A. balsamea* превышает 20% (табл. 8). Эти пихты несомненно следует отнести к видам, которые обладают самыми богатыми популяционно-генетическими ресурсами на нашей планете.

В то же время пихта Семенова, произрастающая в тянь-шаньских горах, имеет поразительно низкие показатели генетической изменчивости, поскольку у нее только 9% локусов являются полиморфными, а каждое дерево гетерозиготно по 1.5% своих генов (табл. 8). Полученные генетические данные свидетельствуют о том, что этот вид, по-видимому, в результате резких климатических изменений прошел через, так называемое “бутылочное горлышко” (“bottle-neck”) естественного отбора, т.е. сократил свою численность до нескольких деревьев. Действие жесткого инбридинга в этот период снизило генетическую изменчивость до полного предела, вследствие чего генотипы абсолютного большинства сохранившихся к настоящему времени деревьев пихты Семенова практически не различаются, и в них почти отсутствует аллельное разнообразие. Из-за этого при скрещивании генетически одинаковых деревьев, формирующих древостой *A. semenovii*, и семенное потомство будет генетически почти не отличаться от материнского. И до тех пор, пока в насаждениях пихты Семенова не восстановится генетический полиморфизм, этот вид вряд ли расширит ареал своего обитания за счет заселения разнообразных экологических ниш. Однако на восстановление генетического разнообразия у *A. semenovii* в сложившейся ситуации могут потребоваться тысячелетия.

Следует добавить, что численность деревьев пихты Семенова, этого важнейшего для тянь-шаньских лесов эндемичного вида за последнее столетие сильно сократилась (Крылов и др., 1986; Артомонов, 1989), особенно в изолированной высокогорной популяции в урочище Беш-Таш на Таласском хребте, где количество взрослых пихт по подсчетам 1990 года не превышает двухсот. Скорее всего, именно влияние инбридинга является одной из главных причин того, что вид все чаще вынужден размножаться вегетативно, пневой порослью и отводками, поскольку вследствие возможной инбредной депрессии большая часть семян *A. semenovii* погибает, чего не наблюдается у *A. alba* в Беловежской пуще. По некоторым данным около четверти насаждений пихты Семенова в Южной Киргизии возникло вегетативно (Артомонов, 1989). Вид находится в угрожающем состоянии, с крайне обедненными популяционно-генетическими ресурсами и его

внесение в Красную книгу СССР (1984) было абсолютно обосновано (Денисова, 1984).

Пихта белая в Беловежской пуше также внесена в Красную книгу Беларуси, но ситуация с ней, к счастью, совершенно иная. Несмотря на то, что в беловежском насаждении сохранилось только 20 деревьев *A. alba* в результате скрещиваний между ними, как уже отмечалось ранее (см. глава 4), может реально образоваться более 13 тысяч различных генотипов и соответственно столько же генетически различающихся потомков, которые могут сформировать новое, генетически более богатое пихтовое насаждение как в Беловежской пуше, так и за ее пределами.

В настоящее время генетическая изменчивость установлена более чем у 600 видов растений, что позволяет проводить сравнительный анализ параметров изменчивости в различных таксономических группах. Ряд интересных исследований обзорного характера проведены Хэмриком с соавторами (Hamrick et al., 1979, 1981, 1992; Hamrick, Godt, 1989). В своих первых работах (Hamrick et al., 1979, 1981) авторы осуществили попытку установить связь между генетической изменчивостью (показатель средней гетерозиготности) и двенадцатью другими параметрами, включающими число хромосом, плодовитость, время генерации, способ распространения семян, величину ареала, систему скрещивания и т. д. Оказалось, что виды долгоживущие, ветроопыляемые перекрестники, занимающие большие ареалы, имеющие высокую плодовитость и в своем местообитании представляющие последнюю стадию сукцессии, имеют более высокую генетическую изменчивость, чем виды с другими комбинациями признаков (Hamrick et al., 1979, 1981). В более поздних обзорах при шестикратном увеличении количества исследованных видов Хэмрик с соавторами подтвердил эти закономерности (Hamrick, Godt, 1989; Hamrick et al., 1992). Поэтому нет ничего удивительного в том, что по параметрам генетической изменчивости хвойные, включая пихты, в полной мере обладающие вышеперечисленными признаками, превосходят практически все группы растений. Более высокие параметры изменчивости выявлены только у древесных видов тропической зоны, средняя гетерозиготность для которых составляет 21.1% (Hamrick, 1989).

В то же время необходимо подчеркнуть тот факт, что эволюционная история вида в некоторых случаях может играть даже более существенную роль в формировании генетической структуры, чем выявленные Хэмриком факторы. В этом можно наглядно убедиться на примере анализа изменчивости у видов, претерпевших сжатие ареалов и в результате жесткого инбридинга потерявших генетический полиморфизм — центральноазиатской пихты *A. semenovii*, а также американских сосен *P. torreyana* Parry ex Carr, *P. resinosa* Ait. (Fowler, Morris, 1977; Allendorf et al., 1982; Ledig, 1986; Mosseler et al., 1991; Гончаренко, Силин, 1997) и средиземноморской сосны *P. halepensis* Mill (Schiller et al., 1986; Conkle et al., 1988; Teisseire et al., 1995; Korol, Schiller, 1996; Agundez et al., 1997; Гончаренко, Силин, 1997).

Возвращаясь к табл. 8 и подводя итог анализа генетической изменчивости у представителей рода *Abies*, необходимо сказать, что приведенные данные по

пихтам еще раз убедительно подтверждают выводы, сделанные Хэмриком с соавторами и Ниво с соавторами (Hamrick et al., 1979, 1981, 1992; Nevo et al., 1984; Hamrick, Godt, 1989) о том, что виды с широкими ареалами (*A. nephrolepis*, *A. sachalinensis*, *A. balsamea*) в целом обладают большей генетической изменчивостью, чем виды с узкой областью распространения (*A. semenovii*). Менее ярко, хотя и без сомнений эту закономерность подтверждают также *A. alba* и *A. sibirica*, которые имеют большие ареалы и достаточно высокие параметры генетического разнообразия среди пихт (табл. 8).

Завершая данную главу, посвященную результатам анализа генетической изменчивости пихты белой как в Беловежской пуше, так и в других популяциях северо-восточной части ареала этого вида, следует сказать, что изолированное беловежское насаждение имеет наиболее бедные популяционно-генетические ресурсы по основным параметрам генетического полиморфизма. Тем не менее, полученные генетические данные позволяют утверждать, что пуцанское насаждение, состоящее только из 20 деревьев, еще не испытало влияния инбридинга, и в настоящее время располагает достаточными ресурсами для успешного и полномасштабного воспроизведения генофонда этой уникальной популяции, в отличие от популяций пихты Семенова, прошедших через стадию жесткого инбридинга и на восстановление генофонда которых могут потребоваться тысячелетия.

Ключевые слова и понятия

уровень генетической изменчивости	“бутылочное горлышко” естественного отбора
состояние популяционно-генетических ресурсов	генотипы
основные параметры полиморфизма	эндемичный вид
доля полиморфных локусов	влияние инбридинга
среднее число аллелей на локус	инбредная депрессия
наблюдаемая гетерозиготность H_o	генетически богатое насаждение
ожидаемая гетерозиготность H_e	эволюционная история вида
генетически богатые деревья	сжатие ареала
генофонд	потеря генетического полиморфизма
действие жесткого инбридинга	виды с широкими ареалами
равновесие по Харди-Вайнбергу	ветроопыляемые перекрестники
пихта Семенова	последняя стадия сукцессий
таксономические группы	воспроизведение генофонда
“bottle-neck”	восстановление генофонда

Вопросы и задачи к главе 5

1. Используя какой метод можно количественно определить уровень генетической изменчивости?

2. Какие параметры дают возможность оценить состояние генофонда каждой популяции?

3. В результате электрофоретического анализа 22 локусов в материале пихты белой из Беловежской пуши полиморфизм был обнаружен по 8 генам. Рассчитайте значение показателя полиморфности (Р) по 99% критерию.

4. В польской популяции Яга количество аллелей в полиморфных локусах распределилось следующим образом: в 12 локусах по два аллеля, в 3 - по три (см. табл.6). Рассчитайте показатели среднего числа аллелей на локус как для всех (А), так и для нередких ($A_{1\%}$) аллелей.

5. Используя табл. 6 (гл. 4) рассчитайте показатели среднего числа аллелей на локус, а также средние наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготности для белорусской популяции Беловежская пуша.

6. Те же самые показатели рассчитайте по табл. 6 для польской популяции Лабовец.

7. На основе данных, приведенных в таблице 7, укажите популяцию, обладающую наиболее богатыми генетическими ресурсами среди восточно-европейских насаждений пихты белой.

8. По данным таблицы 7 определите какая из проанализированных восточно-европейских популяций имеет наименее богатое генетическое разнообразие.

9. Исходя из данных по основным показателям генетического полиморфизма у представителей рода *Abies* (табл. 8) укажите вид пихт, имеющий наиболее бедные популяционно-генетические ресурсы.

10. Чем характеризуются виды, обладающие высокими параметрами генетической изменчивости?

11. На основе каких данных можно утверждать, что пихта Семенова подверглась действию жесткого инбридинга?

12. Чем отличается ситуация с генофондами в популяциях пихты белой в урочище Тисовик и пихты Семенова в урочище Беш-Таш, находящихся в угрожающем состоянии?

Литература

1. Артамонов В. И. Редкие и исчезающие растения. М.: Агропромиздат, 1989. 384. с.
2. Гончаренко Г. Г., Савицкий Б.П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2000. 122 с.
3. Денисова Л. В. Пихта Семенова/ Красная книга СССР. Т. 2. Под ред. Бородин А. М., Банникова А. Г., Соколова В. Е. и др. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Лесная пром-сть, 1984. С. 306.

4. Крылов Г. В., Марадудин И. И., Михеев Н. И., Козакова Н. Ф. Пихта. М.: Агропромиздат, 1986. 239 с.
5. Hamrick J. L., Godt M. J. W. Allozyme diversity in plant species/ Brown A. H. D., Clegg M. T., Kahler A. L., Weir B. S. (eds) Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1989. P. 43–63.
6. Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species// New Forests. 1992. V. 6. P. 95–124.
7. Hamrick J. L., Linhart Y. B., Mitton J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants// Ann. Rev. Ecol. Syst. 1979. V. 10. P. 173–200.
8. Hamrick J. L., Mitton J. B., Linhart Y. B. Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics/ Conkle M.T. (ed) Proc. of the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects (July 27, 1979, Berkeley). USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep. PSW-48 1981. P. 35–41.
9. Nevo E., Beiles A., Ben-Shlomo R. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates// Mani G.S. (ed) Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity. Lecture Notes in Biomathematic 53. 1984. P. 13–213.

Глава 6

Оценка подразделенности и потока генов у пихты белой в популяциях северо-восточной части ареала

Вместе с анализом параметров, которые определяют общий уровень генетической изменчивости, перед популяционными генетиками стоит еще ряд важных вопросов, связанных с выяснением закономерностей в распределении генетической изменчивости в пределах исследованных видов и популяций и оценкой интенсивности обмена генетическим материалом между теми или иными природными популяциями в пределах видового ареала.

Для анализа степени подразделенности природных популяций хвойных исследователи в настоящее время пользуются коэффициентами, предложенными Райтом (F -статистики) и Ней (G -статистики) (Wright, 1965; Nei, 1975; Гончаренко, Савицкий, 2000).

В ходе проведенных исследований на основе F -статистик Райта и G -статистик Ней была предпринята попытка определить состояние равновесия и степень подразделенности природных популяций пихты белой в северо-восточной части ареала данного вида. Значения коэффициентов инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}), инбридинга особи относительно вида в целом (F_{IT}) и инбридинга популяции относительно всего вида (F_{ST}), а также доли межпопуляционного разнообразия (G_{ST}), рассчитанные на основании анализа 22 локусов, ответственных за синтез изоферментов, представлены в табл. 9.

Величины F_{IS} находятся в пределах от -0.254 по Me до 0.049 по $Aat-3$, составляя в среднем -0.035 . Отрицательное среднее значение говорит об избытке гетерозигот в проанализированных восточноевропейских популяциях пихты белой. В то же время коэффициент (F_{IT}) равнялся в среднем 0.005 (табл. 9), что указывает на 0.5% -ный недостаток гетерозигот у *A. alba* в целом. Дефицит гетерозигот для вида в целом, при некотором их избытке в каждой средней популяции может быть объяснен типичным эффектом Валунда.

Таблица 9. Значения показателей F- и G-статистик по 22 локусам в 7 природных популяциях *A. alba*, включая Беловежскую пуцу

Локусы	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
Idh	-0.012	0.062	0.073	0.106
Skdh	0.000	0.009	0.009	0.009
6-Pgd-1	-0.191	-0.159	0.027	0.034
6-Pgd-2	-0.035	-0.017	0.017	0.017
Gdh	-0.004	0.048	0.052	0.052
Aat-1	-0.003	0.020	0.024	0.024
Aat-2	-0.007	0.002	0.009	0.009
Aat-3	0.049	0.082	0.035	0.048
Dia-1	-0.013	0.006	0.020	0.020
Dia-3	0.000	0.000	0.000	0.000
Lap-1	0.034	0.060	0.027	0.031
Lap-2	-0.044	-0.020	0.023	0.023
Pgm-1	-0.026	0.073	0.096	0.096
Pgm-2	-0.072	0.159	0.215	0.215
Hk	-0.013	0.001	0.013	0.013
Me	-0.254	-0.176	0.062	0.048
Fl-Est	0.032	0.042	0.010	0.010
Mdh-1	0.000	0.000	0.000	0.000
Mdh-2	-0.006	0.039	0.045	0.045
Gpi	-0.002	0.005	0.008	0.008
Sdh	0.000	0.000	0.000	0.000
Per	-0.209	-0.121	0.073	0.072
Среднее	-0.035	0.005	0.038	0.040

Показатель подразделенности — F_{ST} для всех множественных аллелей подсчитывался как средневзвешенный по всем популяциям и варьировал в полиморфных локусах от 0.008 (Gpi) до 0.215 (Pgm-2). Среднее значение F_{ST} составило 0.038 (табл. 9). Это говорит о том, что около 96% всей изменчивости находится внутри популяций пихты белой и только 3.8% приходится на межпопуляционную изменчивость. Близкое среднее значение, равное 0.040 (табл. 9), было установлено и по другому показателю, определяющему подразделенность — G_{ST} , который, как было показано Ней (Nei, 1975), эквивалентен параметру F_{ST} . Принимая во внимание различия в характере местопрорастания и определенную географическую удаленность исследованных популяций *A. alba*, а также учитывая изолированность насаждения Беловежская пуца (рис. 13) можно было бы ожидать более высоких

величин показателей, определяющих подразделенность. Однако, полученные значения F_{ST} и G_{ST} , приведенные в табл. 9, могут лишь частично свидетельствовать в пользу существования генетической подразделенности у *A. alba* в северо-восточном фрагменте ее ареала. Необходимо подчеркнуть, что если исключить из анализа изолированную белорусскую популяцию, то показатель F_{ST} для остальных шести популяций сразу понижается почти в два раза до 0.024. Этот результат однозначно указывает на решающий вклад пушанского насаждения в существующую подразделенность у пихты белой в северо-восточной части ее ареала.

Нельзя не отметить также, что у *A. alba* показатели подразделенности оказались в целом выше, чем в проанализированных восточноевропейских популяциях сосны обыкновенной (Гончаренко и др., 1993; Гончаренко, Силин, 1997) и ели европейской (Гончаренко, Потенко, 1991а). В настоящее время существующая подразделенность, составляющая от 11 до 22%, выявлена только для североамериканских видов сосен и елей, таких как *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws., *P. muricata* D. Don, *P. attenuata* Lemm., *P. radiata* D. Don, *P. monticola* Dougl., *P. jeffreyi* Grev. et Balf., *P. pungens* Lamb. и *Picea glauca* (Moench.) Voss. (O'Malley et al., 1979; Millar, 1983; Brown, Moran, 1981; Steinhoff et al., 1983; Furnier, Adams, 1986; Moran et al., 1988; Millar et al., 1988; Tremblay, Simon, 1989; Gibson, Hamrick, 1991). Интересно отметить, что в сводке, приведенной в работе Хэмрика с соавторами, показатель G_{ST} для представителей рода *Abies* в среднем составляет 6.3% (Hamrick et al., 1992).

Отсутствие значительной подразделенности в исследованных восточноевропейских популяциях пихты белой, несмотря на изолированность некоторых из них, по всей видимости, связано с интенсивным обменом генов, существующим в восточноевропейских насаждениях пихты белой. В этом отношении важное значение приобретает показатель F_{ST} , который дает возможность определить не только величину подразделенности популяций, но и позволяет оценить уровень генного потока ($N_e m$), поскольку F_{ST} связан с $N_e m$ следующим соотношением: $F_{ST} = 1/(1 + 4N_e m)$ (Slatkin, 1985a). Используя полученные значения F_{ST} (табл. 9), была рассчитана величина $N_e m$, которая оказалась равной 6.32. Это говорит о том, что изученные популяции *A. alba* обмениваются генетическим материалом в среднем с интенсивностью 6.3 мигранта за поколение. Генный поток между популяциями у пихт может осуществляться как за счет переноса пыльцы, так и семян.

Имеется еще один метод, позволяющий оценивать интенсивность генного потока, который был разработан американским исследовате-

лем Слаткиным (Slatkin, 1985a,b). По этому методу генный поток оценивается на основании **средней частоты уникальных** (встретившихся только в одной популяции) **аллелей** по формуле: $\log_{10} N_e m = (\log_{10} \bar{p}(1) - b)/a$, где $\bar{p}(1)$ – **средняя условная частота уникального аллеля**, а коэффициенты **a** и **b** вычисляются из **средней популяционной выборки** (Barton, Slatkin, 1986). Так как в исследованных восточноевропейских популяциях пихты белой были выявлены 8 уникальных аллелей Idh^0 , $Skdh^{1\ 10}$, $6-Pgd-1^{0\ 90}$, $Gdh^{1\ 10}$, $Aat-1^{0\ 90}$, $Aat-3^{5\ 00}$, $Fl-Est^{0\ 90}$ и $Gpi^{1\ 25}$ (см. табл. 6), оказалось возможным рассчитать величину генного потока и вторым способом. Подставив в формулу $\log_{10} N_e m = (\log_{10} \bar{p}(1) - b)/a$ величину средней условной частоты уникального аллеля $\bar{p}(1)$, составившую в нашем случае для восьми аллелей 0.019, а также значения коэффициентов **a** (–0,576) и **b** (–1,11), соответствующие средней популяционной выборке, получим величину $N_e m$, равную 11.5 мигранта на поколение. Вычисленное этим способом количество мигрантов указывает на несколько более интенсивный обмен генетическим материалом между исследованными популяциями пихты белой, чем было установлено на основе показателя F_{ST} .

Интересно отметить еще один аспект, вытекающий из полученных по генному потоку данных. Поскольку в изолированном насаждении Беловежской пушчи отсутствовали уникальные аллели, то вычисленная скорость обмена в 11.5 мигрантов в определенной степени может служить мерой генного потока только для проанализированных популяций *A. alba* из непрерывной части ареала. В этом отношении необходимо подчеркнуть, что исходя из значений F_{ST} , вычисленных для шести популяций без Беловежской пушчи (0.024), величина генного потока в насаждениях из непрерывного северо-восточного сегмента ареала пихты белой составила 10.2 мигранта на поколение. Иными словами, наличие пушчанского изолята существенно снижает среднюю интенсивность обмена генетическим материалом между восточноевропейскими популяциями *A. alba*. Полученные данные еще раз указывают на то, что беловежское насаждение имеет наиболее своеобразную генетическую структуру и, вследствие этого, вносит наибольший вклад в подразделенность и соответственно, наименьший в поток генов среди исследованных восточноевропейских популяций пихты белой.

В обзорной работе Вайдена и Свенссона (Widen, Svensson, 1992) на основании анализа генного потока у 124 видов растений наимень-

шее среднее значение $N_e m$, не превышающее 1, было выявлено у короткоживущих видов-самоопылителей, а наиболее высокая оценка, равная в среднем 3.5 мигранта на поколение, оказалась характерной для долгоживущих видов-перекрестников. Сравнение этих результатов с представленными в данном пособии показывает, что величина генного потока, составляющая для популяций *A. alba* в среднем более 6 мигрантов на поколение, значительно превышает соответствующие оценки $N_e m$ не только у растений самоопылителей, но и у проанализированных в настоящее время долгоживущих перекрестноопыляющихся видов в целом. Эти данные еще раз хорошо подтверждают выводы Говиндараю (Govindaraju, 1989), в соответствии с которыми наибольшим генным потоком обладают ветроопыляемые перекрестники (в том числе и представители рода *Abies*) по сравнению с другими видами растений.

Ключевые слова и понятия

распределение генетической изменчивости	недостаток гетерозигот
обмен генетическим материалом	эффект Валунда
степень подразделенности популяций	межпопуляционная изменчивость
коэффициент инбридинга особи относительно популяции (F_{IS})	уровень генного потока ($N_e m$)
коэффициент инбридинга особи относительно вида (F_{IT})	средняя частота уникальных аллелей
коэффициент инбридинга популяции относительно вида (F_{ST})	средняя популяционная выборка
доля межпопуляционного разнообразия (G_{ST})	количество мигрантов за поколение
избыток гетерозигот	короткоживущие виды-самоопылители
	долгоживущие виды-перекрестники
	ветроопыляемые перекрестники

Вопросы и задачи к главе 6

1. О чем говорит отрицательное среднее значение показателей F_{IS} и F_{IT} ?
2. Как можно оценить степень генетической подразделенности природных популяций?
3. Почему подразделенность можно вычислять, используя значения как показателя F_{ST} , так и G_{ST} ?
4. На основе каких данных можно заключить, что решающий вклад в подразделенность пихты белой в северо-восточной части ее ареала вносит

насаждение **Беловежская пушта**?

5. Значение **каких показателей** необходимо знать для того, чтобы вычислить **величину генного потока** в природных популяциях?

6. В результате генетического анализа 6 восточноевропейских популяций *A. alba* по 22 локусам значение F_{ST} составило **0.024**. Рассчитайте **величину генного потока ($N_e m$)** для этих шести популяций.

7. Определите **величину генного потока** для природных популяций одного вида, если значение показателя подразделенности F_{ST} у них составило **0.050**.

8. Для одного вида характерна **высокая степень генетической подразделенности**, для другого - **низкая**. У какого вида **более интенсивный генный поток**?

9. **Величина средней частоты уникальных аллелей** в природных популяциях одного вида составила **0.010**. Рассчитайте **значение генного потока**, если в каждой популяции было проанализировано в **среднем 25 особей**.

10. Определите **значение генного потока** в природных популяциях пихты белой при **средней популяционной выборке 25 деревьев** по четырем **уникальным аллелям**, частоты которых составили: Idh^0 - 0.010, $Skdh^{110}$ - 0.011, $6-Pgd^{1090}$ - 0.014, Gdh^{110} - 0.056.

11. Можно ли оценить **вклад популяции Беловежская пушта** в **величину генного потока**, вычисленную на основании **уникальных аллелей**.

Литература

1. Гончаренко Г. Г., Савицкий Б. П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2000. 122 с.
2. Barton N. H., Slatkin M. A Quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population// Heredity. 1986. V. 56. P. 409-415.
3. Govindaraju D. R. Estimates of gene flow in forest trees// Biol. J. Linn. Soc. 1989. V. 37. P. 345-357.
4. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: Holland Press, 1975. 278 p.
5. Slatkin M. Gene flow in natural populations// Ann. Rev. Ecol. Syst. 1985a. V. 16. P. 393-430.
6. Slatkin M. Rare alleles as indicators of gene flow// Evolution. 1985b. V. 39. P. 53-65.
7. Widén B., Svensson L. Conservation of genetic variation in plants — The importance of population size and gene flow/ Hansson L. (ed) Ecological Principles of Nature Conservation. London and New York: Elsevier Applied Science, 1992. P. 113-161.
8. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating// Evolution. 1965. V. 19. P. 395-420.

Глава 7

Генетическая дифференциация в восточноевропейских популяциях пихты белой

Рассмотренные в предыдущей главе параметры позволяют определить, имеется ли подразделенность в популяциях пихты белой и какова в них интенсивность генного потока. Однако, они не отвечают на вопрос, **какие** из исследованных восточноевропейских популяций *A. alba* более **сходны между собой**, а какие отличаются и насколько. Иначе говоря, на основании этих показателей нельзя определить в **какой степени генетически дифференцированы** исследованные популяции.

Для анализа генетической дифференциации разработано несколько коэффициентов. Наиболее точным способом оценки генетической близости и дифференциации по данным электрофореza, который учитывает различия в аллельных частотах всех проанализированных локусов, считается коэффициент генетической дистанции Ней (Nei, 1972). Поэтому уровень дифференциации между семью исследованными восточноевропейскими популяциями пихты белой был установлен на основании коэффициентов генетической дистанции Ней. Найденные значения коэффициентов дистанции (D_N) по 22 генам для популяций *A. alba* представлены в таблице 10. Из таблицы, представленной в виде матрицы, хорошо видно, что **наиболее сходные генетические структуры** оказались у польской популяции Ростоцье и украинской Дрогобыч, поскольку значение D_N между ними было равным всего 0.002, а наибольшие различия выявлены между популяциями Беловежская пуца и Ворохта, где D_N достигла значения 0.050. Как и следовало ожидать, все шесть популяций из непрерывной части ареала имели наибольшие отличия в коэффициенте Ней от насаждения Беловежская пуца (табл. 10). Иными словами беловежская популяция является **наиболее генетически дифференцированной** от остальных проанализированных восточноевропейских насаждений пихты белой.

Таблица 10. Матрица значений коэффициентов дистанции Ней в популяциях *A. alba* северо-восточной части ареала

Виды	Др	Дл	Вр	Ят	Лб	Ро
Беловежская пуца	.026	.034	.050	.032	.025	.026
Дрогобыч		.007	.015	.003	.005	.002
Делятин			.008	.009	.003	.004
Ворохта				.017	.015	.010
Ята					.008	.005
Лабовец						.004

Используя значения коэффициентов генетической дистанции, посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) была построена дендрограмма (рис. 15), позволяющая наглядно проиллюстрировать степень межпопуляционной дифференциации в восточноевропейских популяциях пихты белой.

Как видно из рисунка 15, в центре дендрограммы находится основной кластер, который состоит из пяти украинско-польских популяций, объединенных в пределах дистанции Ней, не превышающей 0.008. Причем, три польские и две украинские популяции дисперсно распределились по кластеру, а не обособились в самостоятельные группы. Справа к основному кластеру с дистанцией, равной 0.013 примкнула еще одна украинская популяция Ворохта (рис. 15). Тот факт, что изолированная от основного ареала беловежская популяция на дендрограмме оказалась самой обособленной, исходя из совокупности всех генетических данных, следует считать закономерным.

В тоже время необходимо отметить величину генетической дистанции, превышающую 0.040, с которой Беловежская пуца замкнула дендрограмму (рис. 15). Интересно, что в работе Мейнартовича (Mejnartowicz, 1996), при анализе материала 11 деревьев Беловежской пуцы по 17 локусам, дистанция Ней между пуцанским насаждением и другими проанализированными им восточноевропейскими популяциями пихты белой составила 0.058.

Обычно, степень межпопуляционной генетической дифференциации у различных видов хвойных не превышает для коэффициента Ней величину 0.030 (Yeh, O'Malley, 1980; Guries, Ledig, 1982; Wheeler, Guries, 1982; Dancik, Yeh, 1983; Woods et al., 1983; Plessas, Strauss, 1986; Ross, Hawkins, 1986; Yeh et al., 1986; Merkle, Adams, 1987; Cheliak et al., 1988; Millar et al., 1988; Giannini et al., 1991; Goncharenko et al., 1993a,b, 1994; Boscherini et al., 1994; Hawley, DeHayes, 1994; Kim et al., 1994; Teisseire et al., 1995; Silin, Goncharenko, 1996; Raja et al.,

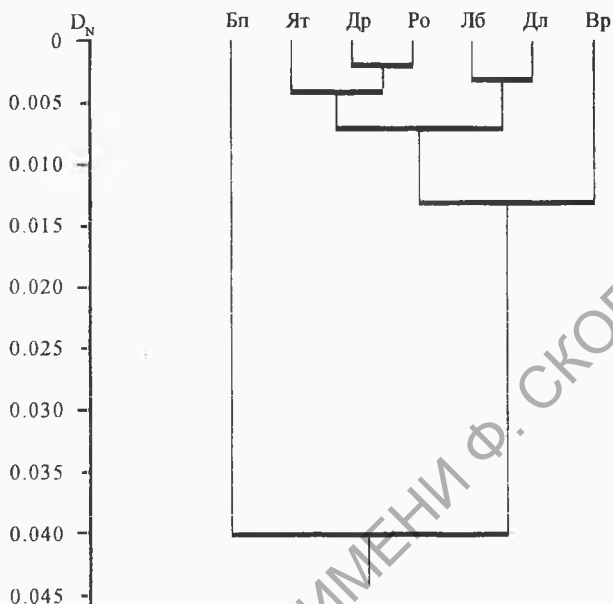


Рис. 15. Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Ней (D_N), показывающая степень генетической дифференциации 7 природных популяций *A. alba* из северо-восточной части ареала этого вида

1997; Гончаренко, Силин, 1997; Rajora et al., 1998). Однако, в случае анализа существенно географически изолированных популяций значение D_N может превышать 0.030, иногда достигая 0.060 (Schiller et al., 1986; Millar et al., 1988; Tremblay, Simon, 1989; Goncharenko et al., 1993a; Гончаренко, Силин, 1997).

Таким образом, полученные данные по величине генетической дистанции между изолированной популяцией Беловежская пуца и остальными проанализированными восточноевропейскими популяциями *A. alba* в целом соответствуют результатам исследований по другим видам хвойных.

С другой стороны нельзя не отметить тот факт, что Беловежская пуца географически удалена от основного ареала пихты белой только на 100 километров. Кроме того, ее изоляция не могла носить долговременного характера, поскольку пихта белая пережила последнее оледенение в трех основных рефугиумах (в Северной Италии, Франции и Балканах) (Konnert, Bergmann, 1995), а ее распространение на европей-

скую равнину в голоцене произошло только в, так называемое, “позднетеплое время” (субатлантический период) (Вульф, 1936; Фукарек и др., 1982). В этом смысле правомерно высказать предположение, что своеобразие генетической структуры пушанского насаждения в первую очередь определяется не его приспособлением к локальным условиям Беловежской пуши и временем изоляции, а эффектом основателя, который по-видимому и обусловил сдвиг аллельных частот в этой популяции в последнем поколении.

Ключевые слова и понятия

степень генетической дифференциации популяций	невзвешенный парно-групповой метод кластерного анализа (UPGMA)
оценка генетической близости и дифференциации	дендрограмма
коэффициент генетической дистанции Ней (D_N)	кластер
уровень дифференциации	основной ареал
генетическая структура	рефугиум
матрица коэффициентов дистанции Ней	голоцен
	эффект основателя
	сдвиг аллельных частот

Вопросы и задачи к главе 7

1. Каким образом можно определить степень генетической дифференциации исследованных популяций?
2. Что учитывает при оценке генетической близости и дифференциации коэффициент генетической дистанции Ней?
3. Используя табл. 6 (гл. 4) рассчитайте значение генетической дистанции Ней (D_N) по локусу *Idh* между популяциями Беловежская пуша и Дрогобыч.
4. Рассчитайте значение коэффициента дистанции Ней (D_N) по локусу *Idh* между популяциями Делятин и Ростоцье.
5. На основе каких данных можно заключить, что наиболее сходные генетические структуры характерны для польской популяции Ростоцье и украинской Дрогобыч, а наиболее различающиеся для Беловежской пуши и Ворохты?
6. Используя матрицу значений коэффициентов D_N , приведенную в таблице 10, построить первые два кластера на шкале D_N для четырех восточно-европейских популяций *A. alba*.
7. Популяция Ростоцье генетически более сходна с популяцией Делятин ($D_N = 0.004$), чем с популяцией Ята ($D_N = 0.005$). Почему на дендрограмме

(рис. 15) Росточье оказалось в одном кластере с популяцией Ята, а не с популяцией Делятин?

8. На основании коэффициентов D_N , приведенных в таблице 10, посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) построить дендрограмму до значения 0.010 по шкале D_N .

9. Исходя из совокупности всех генетических данных какая популяция окажется самой обособленной на дендрограмме?

10. Могла ли носить долговременный характер изоляция пихты белой в Беловежской пушце. Укажите предположительный срок ее изолированного состояния.

11. Чем может быть обусловлен сдвиг в аллельных частотах у пихты белой в популяции Беловежская пушца?

Литература

1. Вульф Е. В. Историческая география растений. М.: Л.: Изд-во АН СССР, 1936. 324 с.
2. Фукарек Ф., Мюллер Г., Шустер Р. Растительный мир Земли. Том 1/ Пер. с нем. М.: Мир, 1982. 136 с.
3. Konnert M., Bergmann E. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinacea) in relation to its migration history// Pl. Syst. Evol. 1995. V. 196. P. 19-30.
4. Mejnartowicz L. Cisovka — the relic population of *Abies alba* and its relationship to man-made silver-fir stands in Bialowieza primeval forest// Acta Soc. Bot. Poloniae. 1996. V. 65. No. 3-4. P. 319-328.
5. Nei M. Genetic distance between populations// Am. Nat. 1972. V. 106. P. 283-292.

Глава 8

Появление пихты белой в Европе и ее эволюционно-филогенетические взаимоотношения с пихтами Палеарктики

Данная глава освещает ряд более широких проблем, касающихся эволюционно-генетической истории и геносистематики пихт Палеарктики. Эти результаты в той или иной степени расширяют представление обучающихся об уровне генетической дифференциации, отражающей **филогенетические взаимоотношения** между пихтами Старого Света, и отчасти позволяют ретроспективно описать историю становления и развития пихты белой, как видового представителя рода *Abies*.

На страницах этого пособия уже отмечалось, что основная часть ареала пихты белой находится в горных районах Европы, включая Карпаты, Альпы, Балканские горы, Апеннины, Пиренеи. На севере граница распространения этого вида проходит ориентировочно по 52° с. ш., а на юге пихта белая доходит до Северной Греции и Южной Италии (Маценко, 1964; Liu, 1971; Vidaković, 1991) (рис. 16). *A. alba* образует **чистые и смешанные** (преимущественно с елью и буком) **насаждения** на высотах от 400 до 2000 метров над уровнем моря и очень редко спускается на равнину как, например, в Беловежье. Площадь лесов с господством пихты достигает 5.5 млн. га (Крылов и др., 1986).

Большинство авторов признает вид *A. alba* в границах ареала, представленного на рис. 16 (Маценко, 1964; Liu, 1971; Krussmann, 1972; Крылов и др., 1986; Vidaković, 1991), разделяя его иногда как, например, Фукарек на ряд климатипов (Fukarek, 1964, цит. по Vidaković, 1991). В то же время, как считает Свобода, *A. alba* занимает более обширный ареал, дополнительно включая в себя в виде климатипов пихты, произрастающие в Греции и Болгарии и в виде экотипа на острове Сицилия (Svoboda, 1953). Однако некоторые исследователи вышеуказанным пихтам придают собственный видовой статус. Так,



Рис. 16. Ареалы пихты белой и пихты Нордмана, произрастающих на территории Палеарктики (по Маценко, 1964; Liu, 1971; Крылов и др., 1986)



— *A. alba*,



— *A. nordmanniana*

пихту, произрастающую в Греции, выделяют в вид *A. cephalonica* Loud., сицилийскую пихту — в *A. nebrodensis* (Lojac.) Mattei., а болгарско-македонскую — в *A. borisii-regis* Mattf. (Маценко, 1964; Krussmann, 1972; Крылов и др., 1986). Касаясь вопроса систематики, Лю в своей обширной монографии считает пихту царя Бориса (*A. x borisii-regis*) только гибридом, не имеющим самостоятельного таксономического статуса (Liu, 1971). На гибридный межвидовой характер пихт царя Бориса и сицилийской указывается и в работе Грегуша и Пауле (Greguss, Paule, 1988). Иными словами, вопрос об **объеме и границах вида *A. alba***, а также о количестве пихт, произрастающих в Средиземноморском регионе, вызывает серьезные дискуссии и в настоящее время далек от окончательного решения.

В этой связи представляет интерес история появления пихты белой на Европейском континенте. Считается, что *A. alba* попала из Южной Сибири или Центральной Азии сначала на Кавказ, откуда в конце третичного периода через Малую Азию перешла в Грецию, затем проникла на Балканский полуостров и Альпы. С Альп она продвинулась на Средне-Германскую возвышенность, а также в Карпаты и Польшу. И наконец, с одной стороны, через Апеннины на Сицилию, а с другой, через Севенны на Пиренейский полуостров (Каппер, 1954). Следы, об-

наруженные в ископаемых остатках, свидетельствуют о произрастании этого вида в Европе с плиоцена (Вульф, 1936; Каппер, 1954). Также к плиоцену относит достоверные ископаемые остатки пихты белой и Маттфельд, который считает, что все находки ископаемых европейских пихт принадлежат *A. alba* (Mattfeld, 1926, цит. по Бобров, 1978). Таким образом, предполагается, что дивергенция пихт Европейского региона относится к совсем недавнему времени.

Необходимо подчеркнуть, что пихты являются обширной группой видов, которые наряду с елями формируют темнохвойные таежные и горные леса Палеарктики. Их значимость как структурного компонента лесов довольно велика, а в некоторых регионах даже первостепенна. Назвать точное количество видов этого рода в Палеарктике не представляется возможным, поскольку их систематика, таксономические и филогенетические взаимоотношения сильно различаются в работах разных авторов. Число выделяемых видов, произрастающих на данной территории, варьирует — от 23 до 41 (Васильев, 1949; Маценко, 1964; Liu, 1971; Krussmann, 1972; Крылов и др., 1986; Vidaković, 1991). Даже в хорошо изученном Средиземноморско-Черноморском регионе одни авторы описывают 3 вида пихт (Svoboda, 1953), а другие 11 (Маценко, 1963, 1964).

Некоторые исследователи на территории Малой Азии в горах вдоль южного побережья Черного моря выделяют вид *A. bornmulleriana* Mattf., а на побережье Эгейского моря — *A. equi-trojani* Aschers. et Sint. (Маценко, 1964; Krussmann, 1972; Крылов и др., 1986). Французский исследователь Арбэ на основе проведенных им специальных исследований приходит к заключению, что на Кавказе и севере Малой Азии произрастает только один вид пихт *A. nordmanniana* (Arbez, 1969, цит. по Vidaković, 1991). Этот вывод совпадает с мнением Свободы (Svoboda, 1953), который включил пихты Борнмюллера и троянскую в качестве климатипов в состав кавказской пихты. Более того, как климатип *A. nordmanniana* он признает и киликийскую пихту, произрастающую на юге Турции, северо-западе Сирии и севере Ливана. В то же время Лю пихту Борнмюллера считает лишь гибридом, а троянскую включает в состав *A. cephalonica* (Liu, 1971).

В Сибирско-Среднеазиатском регионе большинство русскоязычных исследователей выделяют тянь-шаньскую пихту Семенова в качестве самостоятельного вида (Комаров, 1934; Сукачев, 1938; Васильев, 1949; Каппер, 1954; Маценко, 1964; Бобров, 1978; Крылов и др., 1986). Тем не менее Лю, хорошо знакомый с работами Комарова, Васильева и Маценко, рассматривает тянь-шаньскую пихту лишь как вариегат сибирской (Liu, 1971). В той или иной степени отказывают пихте Семенова в самостоятельном видовом статусе и известные исследователи Свобода, Крюссман и Видакович (Svoboda, 1953; Krussmann, 1972; Vidaković, 1991). В Дальневосточном регионе на Сахалине кроме общепризнанного вида *A. sachalinensis* некоторыми авторами выделяются *A. mayriana* Miyabe et Kudo (Васильев, 1949; Маценко, 1964; Бобров, 1978; Денисова, 1984б; Крылов и др., 1986) и *A. wilsonii* Miyabe et Kudo (Васильев, 1949; Крылов и др., 1986). Не всеми признается видовой статус *A. gracilis* Kom., произрастающей на Камчатке (Liu, 1971; Бобров, 1978; Vidaković, 1991).

Эволюционные и филогенетические взаимоотношения пихт Палеарктики также остаются довольно запутанными. До сих пор нет единого мнения о степени родства среди пихт Средиземноморско-Черноморского региона, несмотря на то что время появления и пути их расселения на данной территории (Каппер, 1954) более или менее известны. Так, например, Свобода (Svoboda, 1953) считает пихту киликийскую наиболее родственной с кавказско-малоазиатскими пихтами, рассматривая их как один вид. В отличие от него Лю (Liu, 1971) и Крюсман (Krusmann, 1972) объединяют киликийскую пихту с испано-североафриканскими видами, выделяя их в отдельную секцию. А Маценко (1964) полагает, что киликийская пихта близка с гималайской пихтой Вебба, составляя с последней серию *Webbiana*. Что касается Сибирско-Среднеазиатского региона, то здесь ряд авторов объединяют пихты гималайскую, Семенова и сибирскую в одну серию близкородственных видов, имеющих, по их мнению, общее происхождение (Маценко; 1964; Крылов и др., 1986), в то время как другие исследователи указывают на близость пихты сибирской и дальневосточной пихты белокорой (Liu, 1971; Vidaković, 1991). Не ясны эволюционные и филогенетические взаимоотношения среди пихт Дальнего Востока. Например, Маценко (1964) выделяет такие виды, как *A. mayriana*, *A. veitchii* Lindl., *A. koreana* Wils. и *A. sikokiana* Nakai в серию *Veitchiana*, а виды *A. gracilis*, *A. sachalinensis*,

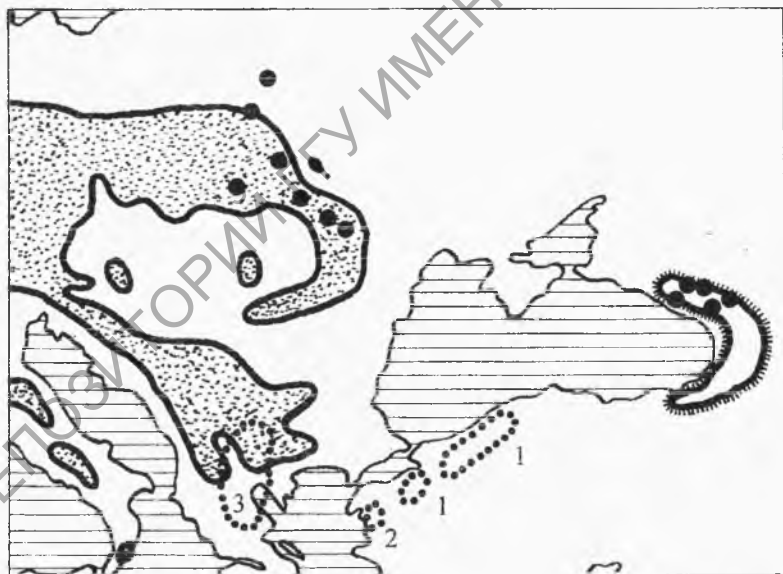


Рис. 17. Ареалы *A. alba*, *A. nordmanniana* и гибридных пихт с указанием мест взятия выборок :  — *A. alba*,  — *A. nordmanniana*,  — *A. × bornmulleriana* (1), *A. × equi-trojani* (2), *A. × borisii-regis* (3), ● — места взятия выборок

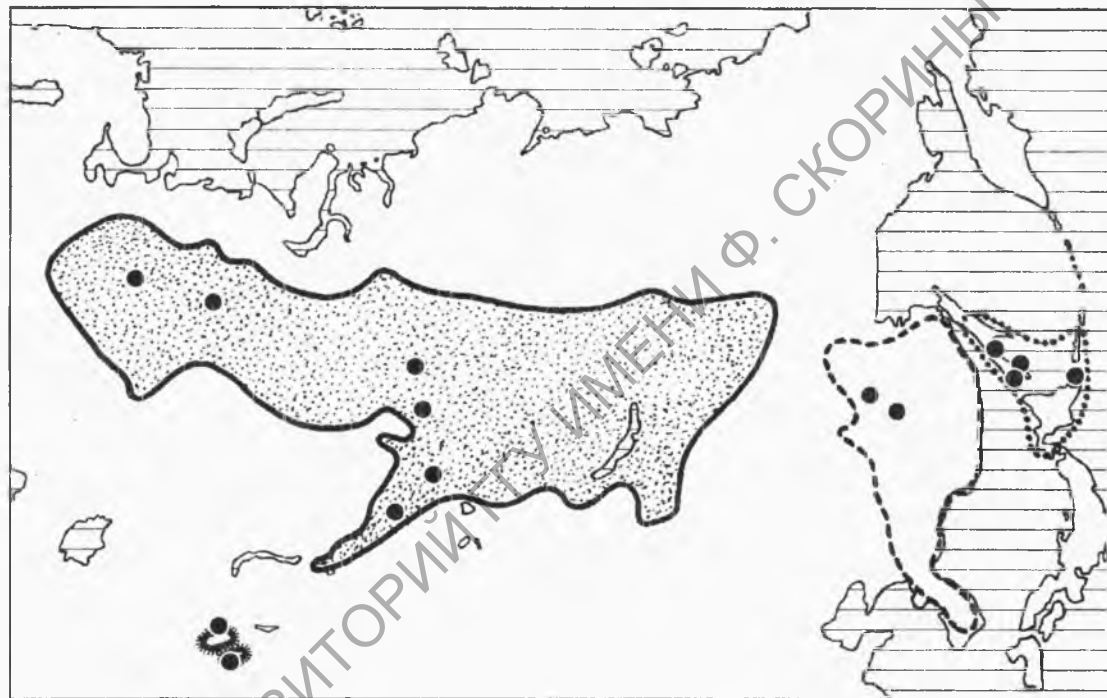


Рис. 18. Ареалы пихт, произрастающих на территории Северо-Восточной Палеарктики (по Машенко, 1964; Крылов и др., 1986) с указанием мест взятия выборок: — *A. sibirica*, — *A. semenovii*, — *A. sachalinensis*, — *A. nephrolepis*,

● — места взятия выборок

A. nephrolepis и *A. recurvata* Mast. в другую серию *Nephrolepides*. В то же время Комаров (1949) рассматривает пихты белокорую, сахалинскую, Вича и изящную как типичный пример географических рас или видов второго порядка, составивших, по всей вероятности, один вполне однородный вид в третичную эпоху.

Вышеназванные проблемы, возникающие при изучении пихт Палеарктики, связаны в первую очередь с тем, что практически все таксономические и эволюционно-филогенетические исследования хвойных проводились с использованием только фенотипических признаков. Как известно, фенотипические отличия часто возникают под влиянием различных условий окружающей среды и не передаются последующим поколениям. Основная часть фенотипических признаков обладает количественными, а не качественными параметрами, что затрудняет не только определение таксономической принадлежности рассматриваемых растений, но и не дает объективных критериев для разделения таксонов. Кроме того, при отборе и при оценке таксономического веса фенотипического признака в ходе выделения таксонов решающее значение приобретает субъективное мнение исследователя. В этой связи единый генетический подход, основанный на анализе изоферментов и фрагментов ДНК (Гончаренко 1999, Vidakovic 1991), в настоящее время является наиболее оптимальным способом, позволяющим независимо от субъективного отношения исследователя получать точные оценки степени генетического родства для морфологических форм, претендующих на различный таксономический статус.

Для исследования эволюционно-филогенетических и таксономических взаимоотношений у шести видов пихт, кроме семи популяций пихты белой был использован материал 5 природных популяций пихты Нордмана, 6 популяций пихты сибирской, 2 популяций пихты Семенова, 2 популяций пихты белокорой и 4 популяций пихты сахалинской. Необходимо отметить, что совместно с основной формой пихты сахалинской (особенно в южной части острова Сахалин) произрастает еще одна форма, так называемая пихта Майра. Генетический анализ этой пихты показал ее полную идентичность с типичной сахалинской, вследствие чего в популяционных выборках она не выделялась в качестве самостоятельной. Месторасположение всех проанализированных природных популяций указано на рис. 17 и 18.

В ходе генетического анализа шести пихт были рассчитаны частоты встречаемости аллелей 22 локусов, отражающие генетическую структуру каждого исследованного таксона (табл. 11). Из табл. 11 хорошо видно, что пихты европейская *A. alba* и кавказская *A. nordmanniana* имеют крайне сходные генетические структуры практически по всем локусам. Некоторые различия между этими пихтами, достигающие по нескольким аллелям 14–34%, найдены только в локусах *Idh*, *Mdh-2*, *Pgm-2*, *6-Pgd-1* и *Me*. Столь же близкие генетические структуры выявлены у дальневосточных пихт сахалинской и белокорой. Здесь определенные различия в аллельных частотах наблюдались по 9 локусам, однако ни в одном случае они не достигали 30% (табл. 11).

Более значительные отличия от пары белокорая–сахалинская имеются у пихты сибирской. Существенные различия между ними обнаружены по четырем локусам *Lar-1*, *Lar-2*, *Pgm-2* и *Per*, а еще по одному локусу — *Me*, различия достигли качественного уровня. Причем если в паре *sibirica*–*sachalinensis*

Таблица 11. Аллельные частоты по 22 локусам у *A. alba*, *A. nordmanniana*, *A. sachalinensis*, *A. nephrolepis*, *A. sibirica* и *A. semenovii*

Локус, аллели	Виды					
	<i>A. alb.</i>	<i>A. nor.</i>	<i>A. sach.</i>	<i>A. neph.</i>	<i>A. sib.</i>	<i>A. sem.</i>
Aat-1						
n	220	164	39	11	64	14
0.90	.005	.0	.0	.0	.0	.0
1.00	.995	.991	.923	1.0	1.0	1.0
1.10	.0	.009	.077	.0	.0	.0
H _o	.009	.018	.103	.0	.0	.0
Aat-2						
n	220	164	39	11	64	14
0.70	.0	.003	.0	.0	.0	.0
0.90	.009	.0	.0	.0	.0	.0
1.00	.991	.967	1.0	1.0	1.0	1.0
1.15	.0	.030	.0	.0	.0	.0
H _o	.018	.055	.0	.0	.0	.0
Aat-3						
n	220	164	39	11	64	14
0	.0	.003	.0	.0	.0	.0
0.30	.0	.0	.0	.045	.0	.0
1.00	.903	.918	1.0	.955	.992	1.0
2.60	.095	.079	.0	.0	.008	.0
5.00	.002	.0	.0	.0	.0	.0
H _o	.150	.152	.0	.091	.016	.0
Skdh						
n	220	164	39	11	64	14
0	.0	.003	.0	.0	.015	.0
0.90	.0	.116	.0	.0	.047	.0
1.00	.998	.881	.013	.227	.047	.0
1.10	.002	.0	.987	.773	.891	1.0
H _o	.005	.213	.026	.455	.141	.0
6-Pgd-1						
n	220	164	39	11	64	14
0	.0	.0	.0	.0	.008	.0
0.90	.002	.003	.0	.0	.0	.0
1.00	.573	.802	.885	.591	.219	.0
1.15	.425	.195	.115	.409	.773	1.0
H _o	.568	.238	.179	.455	.422	.0
6-Pgd-2						
n	220	164	39	11	64	14
0	.0	.006	.0	.0	.0	.0
0.80	.036	.0	.0	.0	.0	.0
0.90	.0	.0	.026	.0	.0	.0
1.00	.964	.991	.743	1.0	.976	1.0
1.10	.0	.003	.231	.0	.024	.0
H _o	.073	.018	.513	.0	.047	.0

Продолжение табл. 11

Локус, аллели	<i>A. alb.</i>	<i>A. nor.</i>	<i>A. sach.</i>	<i>A. neph.</i>	<i>A. sib.</i>	<i>A. sem.</i>
Gdh						
n	220	164	39	11	64	14
0.90	.0	.006	.0	.0	.0	.0
1.00	.995	.985	.013	.0	.016	.0
1.10	.005	.009	.987	1.0	.906	.0
i 15	.0	.0	.0	.0	.078	1.0
H ₀	.009	.030	.026	.0	.141	.0
Dia-1						
n	220	164	39	11	64	14
0	.014	.018	.026	.0	.0	.0
0.75	.0	.0	.077	.364	.0	.0
1.00	.986	.982	.859	.636	1.0	1.0
1.25	.0	.0	.039	.0	.0	.0
H ₀	.027	.037	.231	.727	.0	.0
Dia-3						
n	220	164	39	11	64	14
1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₀	.0	.0	.0	.0	.0	.0
Lap-1						
n	189	164	39	11	64	14
0	.0	.0	.026	.0	.0	.0
0.95	.058	.034	.346	.273	.969	.036
1.00	.910	.945	.602	.545	.031	.964
1.05	.032	.021	.026	.182	.0	.0
H ₀	.159	.110	.564	.455	.063	.071
Lap-2						
n	179	164	39	11	64	14
0.95	.169	.125	.0	.0	.0	.0
1.00	.704	.729	.218	.0	.726	.0
1.05	.127	.146	.782	1.0	.274	1.0
H ₀	.464	.463	.282	.0	.188	.0
Pgm-1						
n	220	164	39	11	64	14
0.85	.0	.0	.949	1.0	.898	.0
0.90	.0	.0	.0	.0	.102	.0
0.95	.025	.012	.0	.0	.0	.0
1.00	.975	.979	.051	.0	.0	1.0
1.05	.0	.009	.0	.0	.0	.0
H ₀	.050	.043	.103	.0	.141	.0
Pgm-2						
n	220	164	39	11	64	14
1.00	.857	.997	.064	.364	.218	1.0
1.10	.143	.003	.936	.636	.289	.0
1.20	.0	.0	.0	.0	.493	.0
H ₀	.214	.006	.128	.364	.609	.0

Продолжение табл. 11

Локус, аллели	<i>A. alb.</i>	<i>A. nor.</i>	<i>A. sach.</i>	<i>A. neph.</i>	<i>A. sib.</i>	<i>A. sem.</i>
Idh						
n	220	164	39	11	64	14
0	.002	.0	.0	.0	.0	.0
0.70	.0	.003	.0	.0	.0	.0
1.00	.536	.866	.0	.0	.0	.0
1.15	.0	.009	.013	.0	.0	.0
1.30	.462	.122	.987	1.0	.992	1.0
1.40	.0	.0	.0	.0	.008	.0
H _o	.445	.238	.026	.0	.016	.0
Me						
n	175	164	37	11	64	14
0	.014	.0	.0	.0	.008	.0
0.70	.0	.0	.135	.0	.992	.071
0.85	.0	.0	.865	1.0	.0	.858
0.95	.240	.055	.0	.0	.0	.071
1.00	.746	.945	.0	.0	.0	.0
H _o	.486	.110	.162	.0	.016	.286
Sdh						
n	144	164	39	5	64	14
0	.0	.0	.0	.100	.0	.0
0.90	.0	.003	.077	.300	.220	.0
1.00	1.0	.997	.872	.600	.771	.0
1.10	.0	.0	.051	.0	.009	1.0
H _o	.0	.006	.205	.600	.188	.0
Hk						
n	220	164	39	11	64	14
0.90	.0	.0	.0	.0	.172	.0
1.00	.984	1.0	1.0	1.0	.828	1.0
1.10	.016	.0	.0	.0	.0	.0
H _o	.032	.0	.0	.0	.313	.0
Mdh-1						
n	202	164	39	11	64	14
0.80	.0	.003	.269	.045	.0	.0
1.00	1.0	.997	.731	.955	1.0	1.0
H _o	.0	.006	.436	.091	.0	.0
Mdh-2						
n	202	164	39	11	64	14
0.80	.012	.325	.757	.500	.062	.0
1.00	.988	.675	.243	.500	.938	1.0
H _o	.025	.396	.282	.273	.078	.0
Fl-Est						
n	220	164	39	11	64	14
0.90	.003	.006	.256	.318	.0	.0
1.00	.997	.994	.744	.682	1.0	1.0
H _o	.005	.012	.410	.636	.0	.0

Продолжение табл. 11

Локус, аллели	<i>A. alb.</i>	<i>A. nor.</i>	<i>A. sach.</i>	<i>A. neph.</i>	<i>A. sib.</i>	<i>A. sem.</i>
Gpi						
n	220	164	39	11	64	14
1.00	.998	.948	.0	.0	.0	.0
1.25	.0	.0	.039	.0	.0	.0
1.45	.002	.049	.0	.0	.0	.0
1.65	.0	.0	.115	.0	.0	1.0
1.75	.0	.0	.846	1.0	1.0	.0
2.00	.0	.003	.0	.0	.0	.0
H_o	.005	.091	.231	.0	.0	.0
Per						
n	167	38	21	11	50	13
0.90	.037	.0	.429	.545	.0	.0
1.00	.951	1.0	.571	.455	1.0	1.0
1.05	.012	.0	.0	.0	.0	.0
H_o	.108	.0	.619	.545	.0	.0

Примечание. *A. alb.* — пихта белая, *A. nor.* — пихта Нордмана, *A. sach.* — пихта сахалинская, *A. neph.* — пихта белокорая, *A. sib.* — пихта сибирская, *A. sem.* — пихта Семенова; n — количество проанализированных деревьев, H_o — значение наблюдаемой гетерозиготности.

имеется незначительное перекрытие в частотах аллеля $Me^{0.70}$, то в паре *sibirica-nephrolepis* произошла полная фиксация альтернативных аллелей (табл. 11). Айала и Пауэлл (Ayala, Powell, 1972), а также Левонтин (Lewontin, 1974) предлагают называть локусы, по которым обнаружены качественные различия, диагностическими. Они считают диагностическим, любой локус, позволяющий определять видовую принадлежность особи с ошибкой менее 5%.

Вопреки ожиданию, пихта сибирская и пихта Семенова, произрастающие в Сибирско-Среднеазиатском регионе, отличаются друг от друга в большей степени, чем пихта сибирская и дальневосточные пихты. Так, только диагностические различия между *A. sibirica* и *A. semenovii* выявлены по 6 локусам — Gdh, Gpi, Pgm-1, Pgm-2, Sdh и Me. Кроме того, существенно различаются у этих видов аллельные частоты и по локусам, кодирующим лейцинаминопептидазу-1 и лейцинаминопептидазу-2 (табл. 11). Электрофоретические спектры глюкозофосфатизомеразы и фосфоглюкомутазы, которые контролируются диагностическими генами у *A. sibirica* и *A. semenovii*, представлены на рис. 19 и 20.

Для точной оценки уровня генетической дифференциации между исследованными пихтами использовался коэффициент генетической дистанции Ней (Nei, 1972), который учитывает различия по всем, а не только по существенно различающимся и диагностическим локусам. Значения коэффициентов генетической дистанции, полученные для шести пихт Палеарктики, приведены в табл. 12. Как следует из таблицы, наиболее близкими пихтами оказались *A. alba* и *A. nordmanniana*, коэффициент D_N между которыми составил всего 0.018

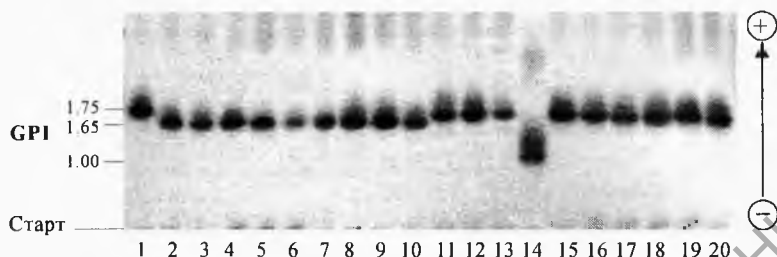


Рис. 19. Электрофореграмма глюкозофосфатизомеразы из гаплоидных эндоспермов *A. sibirica* (дорожки 1, 11–13, 15–20), *A. semenovii* (дорожки 2–10) и *A. alba* (дорожка 14): 1, 11–13, 15–20 — GPI^{1.75}; 2–10 — GPI^{1.65}; 14 — GPI^{1.00}



Рис. 20. Электрофореграмма фосфоглюкомутазы из гаплоидных эндоспермов *A. nordmanniana* (1,2, 4–6), *A. semenovii* (дорожка 3), *A. sibirica* (дорожки 7–13, 17–20) и *A. alba* (дорожки 14–16): 1–3, 15 — PGM-1^{1.00} PGM-2^{1.00}; 4–6 — PGM-1^{0.95} PGM-2^{1.00}; 7–10, 13, 17 — PGM-1^{0.90} PGM-2^{1.20}; 11, 12, 18 — PGM-1^{0.85} PGM-2^{1.00}; 14, 16 — PGM-1^{0.95} PGM-2^{1.10}; 19, 20 — PGM-1^{0.85} PGM-2^{1.20}

Иными словами, эти пихты отличаются лишь по 2% своих локусов, что характерно только для географически связанных популяций одного вида (значение D_n между которыми находится в пределах от 0 до 0.03), тогда как дистанция Ней даже между молодыми видами с неполным репродуктивным барьером обычно составляет 0.10 (Dancik, Yeh, 1983; Wheeler et al., 1983; Wheeler, Guries, 1987; Millar et al., 1988; Goncharenko et al., 1992, 1995; Hawley, DeHayes, 1994; Гончаренко, 1999). Поэтому столь близкие генофонды пихты белой и пихты Нордмана не позволяют на генетическом уровне подтвердить их самостоятельный видовой статус. Учитывая тот факт, что Свобода (Svoboda, 1953) расширяет объем пихты белой, включая в нее болгаро-македонскую *A. borisii-regis* и греческую *A. cephalonica*, и вместе с Арбэ (по Vidakovič, 1991) увеличивает объем пихты кавказской, введя в ее состав *A. bornmulleriana* и *A. equi-trojani*, а Лю (Liu, 1971) считает троянскую и греческую пихты одним видом, логично высказать предположение, что все эти пихты представляют со-

Таблица 12. Значения коэффициентов дистанции Ней для представителей рода *Abies* Палеарктики

Виды	<i>A. nor.</i>	<i>A. sach.</i>	<i>A. neph.</i>	<i>A. sib.</i>	<i>A. sem.</i>
<i>A. alba</i>	.018	.457	.436	.381	.342
<i>A. nordmanniana</i>		.473	.473	.446	.398
<i>A. sachalinensis</i>			.039	.184	.380
<i>A. nephrolepis</i>				.182	.322
<i>A. sibirica</i>					.368

бой единый вид, арсал которого только недавно разделился на отдельные участки (рис. 17). Если это так, то популяционно-генетические структуры пихт, произрастающих по линии Карпаты–Альпы–Балканы–Малая Азия–Кавказ, должны быть такими же, как и у проанализированных восточно-карпатских и кавказских популяций. В любом случае объемы и границы *A. alba* и *A. nordmanniana*, по-видимому, значительно шире, чем принято считать.

Второй близкой видовой парой с D_N , равной только 0.039, оказались дальневосточные пихты сахалинская и белокорая (табл. 12). Такая низкая величина коэффициента генетической дистанции говорит о практически полном отсутствии дифференциации в их генофондах и поэтому имеются серьезные основания для объединения этих пихт в единый вид. Этот вывод неудивителен, поскольку еще Комаров отмечал в своей “Флоре Маньчжурии”, что по анатомическому строению хвои среди дальневосточных пихт он не может отличать только *A. nephrolepis* от *A. sachalinensis* (Комаров, 1949).

Совсем другая ситуация складывается в паре *A. sibirica*–*A. semenovii*. Коэффициент генетической дистанции в данном случае достигает 0.368 (табл. 12), что в сочетании с целым рядом диагностических локусов (*Gpi*, *Sdh*, *Me*, *Gdh*, *Pgm-1* и *Pgm-2*) позволяет однозначно утверждать о видовой самостоятельности пихты Семенова, в чем ей отказывалось в работах некоторых исследователей (Liu, 1971; Крюссман, 1986; Vidaković, 1991). Более того, при столь высоком уровне генетических различий, затрагивающих около 37% генов, *A. sibirica* и *A. semenovii* нельзя считать близкими видами.

На основании коэффициентов генетической дистанции Ней посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) построена дендрограмма, наглядно демонстрирующая степень генетического сходства и характер филогенетических взаимоотношений среди изученных пихт (рис. 21). Из дендрограммы хорошо видно, что пихты белая и кавказская четко отделяются от группы пихт азиатского происхождения и образуют самостоятельный кластер. Причем, как следует из временной шкалы, рассчитанной по формулам Ней (см. главу 3), окончательное разделение *A. alba* и *A. nordmanniana*, по-видимому, произошло в результате воздействия последнего оледенения. Что же касается времени расхождения изученных европейских и азиатских пихт, то события, приведшие к такой дивергенции, происходили значительно ранее, еще в третичную эпоху.

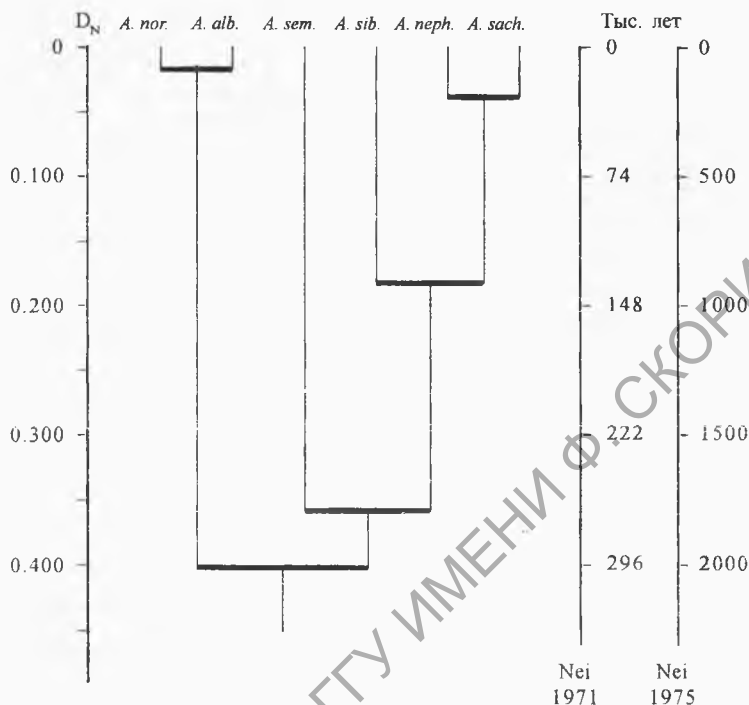


Рис. 21. Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Неи (D_N), показывающая степень генетической дифференциации и время дивергенции для 6 видов пихт Палеарктики

В группе азиатских пихт, как и следовало из данных таблицы 12, наиболее близкой оказалась пара *sachalinensis-nephrolepis* (рис. 21). Причем низкий коэффициент дистанции Неи и отсутствие существенно различающихся локусов у этих пихт хорошо согласуются с предположением Комарова в той его части, где он считает пихты сахалинскую и белокорую географическими расами (Комаров, 1949). В то же время предположение о пихте белокорой как о вариации пихты сибирской, промелькнувшее в некоторых работах (Качалов, 1970; Крюсман, 1986), по полученным данным не имеет под собой никаких генетических оснований, поскольку коэффициент генетической дистанции между этими пихтами достигает 0.182 (табл. 12), что обычно характеризует хвойные с четким видовым статусом (Conkle et al., 1988; Millar et al., 1988; Гончаренко, 1999). Кроме того, пихта сибирская отличается от белокорой (и сахалинской) по одному существенно различающемуся (*Pgm-2*) и одному диагностическому (*Me*) генам. Это является еще одним свидетельством определенной обособленности пихты сибирской от сахалинско-белокорой.

К дальневосточных пихтам на дендрограмме последовательно подсоединяются пихта сибирская, а затем пихта Семенова (рис. 21). Иными словами, тяньшаньская пихта первой из изученных представителей рода *Abies* азиатского происхождения отделилась от общего ствола и развивалась самостоятельно, в то время как пихты сибирская и сахалинско-белокорая в течение длительного времени продолжали оставаться единой группой. Таким образом, совокупность всех полученных генетических данных не позволяет рассматривать пихты сибирскую и Семенова не только в качестве одного вида, как это делают ряд авторов (Svoboda, 1953; Liu, 1971; Vidakoviċ, 1991), но даже считать близкородственными видами, входящими в одну таксономическую серию, как предлагают Маценко (1964), Бобров (1978) и Крылов с соавторами (1986). В связи с этим вызывает сомнение правомерность использования при выделении видовых серий, как это делает Маценко (1964), в качестве одного из основных такого критерия, как географическое расположение ареалов. Также ничем не обосновано с генетической точки зрения и предположение Крылова с соавторами (1986) о происхождении *A. sibirica* от *A. semenovii*. По всем данным, эти пихты имеют длительную независимую историю существования. В отличие от пихты сибирской, родственной дальневосточным пихтам, ближайшие родственники пихты Семенова, если они сохранились, произрастают в Гималаях. Интересно отметить, что ель Шренка, распространенная на Тянь-Шане, также существенно генетически обособлена от ели сибирской (Гончаренко, 1999). Несмотря на почти соприкасающиеся ареалы.

Что касается родственных отношений пихты сибирской с дальневосточными, то полученные результаты генетического анализа в совокупности с палеонтологическими данными о произрастании в миоцене на Урале пихты, близкой к современной японской пихте Вича (Бобров, 1978), позволяют с новых позиций рассматривать историю заселения пихтами Сибири и Дальнего Востока. По-видимому, в результате усиления в начале плейстоцена континентальности климата в Сибири (Лазуков, 1981), а позднее и оледенений эта вичеподобная прапихта была оттеснена частично на Алтай, а частично на Дальний Восток. Пережившая этот период в Алтайском рефугиуме пихта, уже сформировавшаяся как сибирская, позднее распространилась по всей Сибири. Другая же часть правиды, сохранившаяся на Дальнем Востоке, дала начало целому комплексу дальневосточно-японских пихт.

Подводя итог генетико-таксономическому анализу пихт Палеарктики и суммируя результаты проведенных исследований, становится очевидным, что близкая генетическая структура в парах *alba-nordmanniana* и *sachalinensis-nephrolepis* дает основания рассматривать эти пихты только как таксоны внутривидового ранга. Поэтому пихту белую целесообразно рассматривать в качестве *Abies alba* var. *alba*, пихту кавказскую — *Abies alba* var. *nordmanniana*, пихту белокорую — *Abies nephrolepis* var. *nephrolepis*, а пихту сахалинскую — *Abies nephrolepis* var. *sachalinensis* (Гончаренко, 1999; Гончаренко, Савицкий, 2000). Кроме того, не вызывает сомнений тот факт, что

A. semenovii гентически существенно отличается от *A. sibirica* и, вопреки мнению некоторых систематиков, является видом не только самостоятельным таксономически, но и обособленным от пихты сибирской филогенетически. Таким образом, стратегия сохранения видового разнообразия, а также комплекс природоохранных и лесовосстановительных мероприятий должны пересматриваться с учетом генетических данных и соответствующей таксономической ревизии.

Ключевые слова и выражения

эволюционно-генетическая история геносистематика филогенетические взаимоотношения история становления и развития пихты белой чистые насаждения смешанные насаждения граница ареала климатип экотип видовой статус объем вида граница вида история появления пихты белой на Европейском континенте ископаемые остатки плиоцена дивергенция пихт темнохвойные таежные и горные леса Палеарктики структурный компонент лесов таксономические и филогенетические взаимоотношения таксономическая секция серия близкородственных видов географическая раса вид второго порядка фенотипические отличия	критерии для разделения таксонов единый генетический подход изоферменты оценка генетического родства морфологические критерии существенно различающиеся локусы генные различия качественного уровня фиксация альтернативных аллелей диагностические локусы молодые виды с неполным репродуктивным барьером группа пихт азиатского происхождения самостоятельный кластер воздействия последнего оледенения третичная эпоха таксономическая серия географический критерий вида миоцен история заселения пихтами Сибири и Дальнего Востока плейстоцен рефугиум генетико-таксономический анализ
--	--

таксоны внутривидового ранга стратегия сохранения видового разнообразия комплекс природоохранных	мероприятий лесовосстановительные меро- приятия таксономическая ревизия
---	--

Вопросы и задачи к главе 8

1. Почему вопрос об **объеме и границах вида** *A. alba*, а также о количестве пихт, произрастающих в Средиземноморском регионе, вызывает серьезные дискуссии и далек от окончательного решения?

2. Каким пихтам, из произрастающих в Европе, кроме *A. alba* некоторые ученые придают **собственный видовой статус**?

3. Откуда и когда **древний предок** пихты белой попал в **кавказский регион**?

4. Каким образом **пихта белая** попала на **Балканы**?

5. О чем свидетельствует **ископаемые остатки** пихты белой, найденные на **Европейском континенте**?

6. Почему **систематика, таксономические и филогенетические взаимоотношения** среди пихт Палеарктики **сильно различаются** в работах разных авторов?

7. Почему электрофоретический метод анализа **изоферментов** в настоящее время является наиболее оптимальным способом **оценки** степени **генетического родства** для морфологических форм, претендующих на различный таксономический статус?

8. Почему для пары пихт сибирская и сахалинская локус Me (см. табл. 11) считается **диагностическим**?

9. По какому локусу в паре *sibirica-nephrolepis* (см. табл. 11) произошла полная **фиксация альтернативных аллелей**?

10. Исходя из электрофоретического спектра глюкозофосфатизомеразы (рис. 19), **вычислите аллельные частоты** для локуса Gpi у *A. sibirica* и *A. semenovii* и укажите можно ли считать этот локус **диагностическим**?

11. По сколько **диагностическим** локусам пихта белокорая отличается от пихты сахалинской?

12. На основе каких данных можно заключить, что наиболее **близкие генофонды** оказались у **пихты белой** и **пихты Нордмана**?

13. Почему нет никаких оснований на **генетическом уровне** подтвердить их **самостоятельный видовой статус** *A. alba* и *A. nordmanniana*?

14. Почему у пихт *A. bornmulleriana*, *A. equi-trojani*, *A. cephalonica*, *A. borisii-regis*, произрастающих на территории Малой Азии и Балканского полуострова (стр. 86-87), генофонды должны быть такими же, как у проанализированных восточно-карпатской *A. alba* и кавказской *A. nordmanniana*?

15. На территории Палеарктики произрастают два таксона хвойных генетическая дистанция Nei между которыми составила 0.039. Исходя из генетических данных на какой таксономический статус могут претендовать эти хвойные?

16. Используя матрицу значений коэффициентов D_N , приведенную в таблице 12, построить первые два кластера на шкале D_N для четырех пихт Палеарктики.

17. На основании коэффициентов D_N , приведенных в таблице 12, посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) построить дендрограмму для пихт Палеарктики до значения 0.400 по шкале D_N .

18. Почему *A. sibirica* и *A. semenovii* нельзя считать близкими видами?

19. Сохранила бы свою ценность генофонд пихты Семенова если бы она оказалась лишь краевой популяцией пихты сибирской, как считали многие исследователи, а не самостоятельным видом?

Литература

- Бобров Е. Г. Лесообразующие хвойные СССР. Л.: Наука, 1978. 190 с.
- Вульф Е. В. Историческая география растений. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1936. 324 с.
- Гончаренко Г. Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики/ Мн.: Техналогия, 1999. 188 с.
- Гончаренко Г. Г., Савицкий Б. П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2000. 122 с.
- Каппер О. Г. Хвойные породы. М.; Л.: Гослесбумиздат, 1954. 304 с.
- Крылов Г. В., Марадудин И. И., Михеев Н. И., Козакова Н. Ф. Пихта. М.: Агропромиздат, 1986. 239 с.
- Маценко А. Е. Пихты восточного полушария/ Флора и систематика высших растений. Вып. 13. (Труды Ботанического института имени В. Л. Комарова. Серия I). М.; Л.: Наука, 1964. С. 3–103.
- Ayala F. J., Powell J. R. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*/ Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. P. 1094–1096.
- Goncharenko G. G., Padutov V. E., Silin A. E. Population structure, gene diversity, and differentiation in natural populations of Cedar pines (*Pinus* subsect. *Cembrae*, Pinaceae) in the USSR. // Pl. Syst. Evol. 1992. V. 182. P. 121–134.
- Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E. Intra- and interspecific genetic differentiation in closely related pines from *Pinus* subsection *Sylvestres* (Pinaceae) in the former Soviet Union// Pl. Syst. Evol. 1995. V. 194. P. 39–54.
- Greguss L., Paule L. Artificial hybridization in the genus *Abies* (review)/ Paule L., Korpel S. (eds) 5. IUFRO-Tannensymposium. Zvolen: Hochschule für Forstwirtschaft und Holztechnologie. 1988. P. 179–188.
- Krussmann G. Handbuch der Nadelgehölze. S. Berlin, 1972. 366 p.
- Lewontin R. C. The Genetic Basis of Evolutionary Change. New York; London: Columbia University Press, 1974. 351 p.
- Liu T. S. A Monograph of Genus *Abies*. Taipei, Taiwan, 1971. 608 p.
- Nei M. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from

electrophoretic data on protein identity// Am. Nat. 1971. V. 105. P. 385-398.

16. Nei M. Genetic distance between populations// Am. Nat. 1972. V. 106. P. 283-292.

17. Svoboda P. Lesní Dřeviny a Jejich Porosty. Praha, 1953. 411 p.

18. Vidaković M. Conifers Morphology and Variation. Zagreb: Grafički zavod Hrvatske, 1991. 765 p.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Глава 9

Как сохранить генофонд белорусской популяции пихты белой для последующих поколений

Результаты проведенных в последнее десятилетие XX века исследований, изложенные в предыдущих главах, позволили получить обширную информацию о генетических процессах, протекающих у пихты белой в природных популяциях северо-восточной части ареала этого вида (Гончаренко и др., 1996; Mejnartowicz, 1996; Goncharenko et al., 1997; Гончаренко, Савицкий, 2000). С генетических позиций установлены также эволюционно-филогенетические и таксономические взаимоотношения пихты белой с другими Палеарктическими представителями рода *Abies*. На основе генных частот и параметров генетического полиморфизма была дана сравнительная оценка состоянию генофонда семи природных популяций пихты белой, включая Беловежскую пушу. Иными словами, в результате генетического анализа удалось решить обширный спектр фундаментальных вопросов, касающихся популяционно-генетических ресурсов пихты белой.

Не менее важным достоинством полученных данных является то, что они впервые на генетической основе дают возможность разработать конкретные технологические мероприятия, без которых сохранение генофонда пушанского насаждения для последующих поколений будет просто невозможно.

Как уже отмечалось ранее на страницах этого пособия, природное насаждение пихты белой в Беловежской пуше, несмотря на изоляцию и малые размеры, еще не испытало влияния инбридинга и хотя в нем сохранилось только 20 деревьев в результате скрещиваний (перекрестного опыления) между ними можно реально получить 13122 генетически различающихся потомка (глава 4). Этот факт однозначно указывает на то, что имеются все предпосылки для успешного формирования нового генетически более богатого пихтового

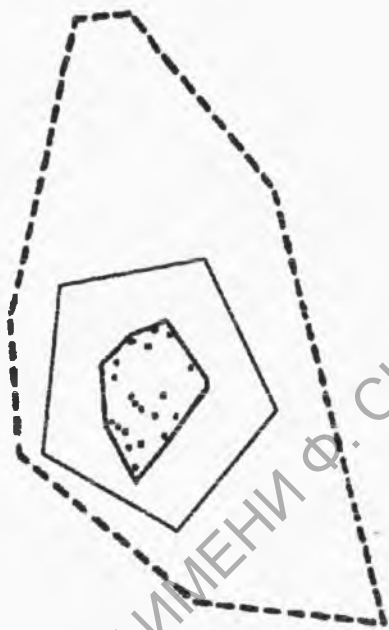


Рис. 22. Границы урочища Тисовик (- - -) и огражденного участка произрастания пихты белой (—)

насаждения в Беловежской пуше в границах территории урочища Тисовик. Для этого необходимо в подросте из 13 тысяч возможных генотипов сохранить, по крайней мере, 400 наиболее богатых по параметрам генетического разнообразия потомков, обеспечив им за счет лесовосстановительных мероприятий возможность достичь стадии плодоношения. Разработанные методы анализа 22 генов позволят провести генетическую идентификацию деревьев в подросте и тем самым дадут возможность уже на ранних стадиях выявить наиболее ценные экземпляры. По наблюдениям белорусских исследователей, естественное возобновление пихты белой на территории Тисовика в границах выдела (рис. 22) в последние годы идет в целом неплохо (Стрелков и др., 1996; Гончаренко, Савицкий, 2000), что еще раз свидетельствует об отсутствии инбредной депрессии в семенном потомстве сохранившихся деревьев. Количество 2–5-летнего подроста по учетам 1992–1995 годов колебалось от 2.1 тыс. до 16 тыс. шт. на 1 га.

В то же время необходимо подчеркнуть, что уже в течение многих десятилетий подрост пихты старше пятилетнего возраста в Тисовике не встречается. Главной, если не единственной причиной сложившейся ситуации является повреждение подростка дикими животными. Поэтому, прежде всего **необходимо безотлагательно организовать более эффективную защиту пихтового подростка от животных**. В первую очередь нужно укрепить заграждения, повысить их плотность и увеличить высоту. Кроме того, крайне целесообразно **не считаясь с затратами расширить размеры пихтового выдела до 2,5 га за счет включения в него дополнительной территории**, на которую попадают семена пихты во время разлета.

Нельзя не отметить еще один важный аспект, касающийся сохранения генофонда природной популяции пихты белой в Беловежской пуше. В некоторых публикациях высказывается мнение, что пихту белую в Беларуси относить к местным породам можно лишь формально, и она здесь в недалеком будущем (к 2120 году) совершенно исчезнет (Шкутко, Мартинович, 1987; Романюк, 1997). Беловежское природное насаждение *A. alba* в настоящее время действительно находится на краю своего ареала и произрастает не в самых благоприятных для вида условиях. Тем не менее, **сохранение** доставшегося нам в силу исторически сложившихся обстоятельств **богатейшего уникального природного генетического ресурса** европейского масштаба, следует считать одной из приоритетнейших задач как для научного сообщества, так и для лесохозяйственных и природоохранных структур республики. **Совокупность имеющихся генетических и биологических данных** говорит о том, что в настоящее время **сохраняются все возможности спасти ценнейший генофонд пихты белой и грамотно им распорядиться**.

Ключевые слова и выражения

генетические процессы в природных популяциях пихты белой популяционно-генетические ресурсы конкретные технологические мероприятия новое генетически более богатое насаждение	сохранить 400 генетически богатых потомков стадия плодоношения отсутствие инбредной депрессии эффективная защита пихтового подростка возможности спасти ценнейший генофонд пихты белой
---	--

Вопросы и задачи к главе 9

1. В чем заключается информация о генетических процессах, протекающих в природных популяциях пихты белой в северо-восточной части ареала этого вида?

2. Какие фундаментальные вопросы, касающиеся популяционно-генетических ресурсов пихты белой, удалось решить в результате проведенных генетических исследований?

3. На чем основано заключение, что имеются все предпосылки для успешного формирования нового генетически более богатого пихтового насаждения в Беловежской пушче в границах территории урочища Тисовик?

4. При плодоношении всех 20 деревьев пихты белой в природной популяции Беловежской пушчи можно получить более 13 тысяч генетически различающихся потомков. Сколько потомков с различными генотипами можно будет получить, если в плодоношении будут участвовать 16 деревьев (кроме деревьев №1, №2, №17 и №29)?

5. Сколько генетически различающихся потомков пихты белой можно будет получить, если в плодоношении будут участвовать 14 деревьев (кроме №1, №3, №6, №7, №8 и №11)?

6. Сколько генетически различающихся потомков пихты белой можно будет получить, если в плодоношении будут участвовать только 2 генетически богатых дерева №1 и №3?

7. Какие меры следует предпринять для защиты пихтового подростка в Тисовике?

8. Почему совокупность имеющихся генетических и биологических данных говорит о том, что в настоящее время сохраняются все возможности спасти ценнейший генофонд пихты белой на территории Беловежской пушчи?

9. Как наиболее грамотно следует распорядиться сохранившимся в Беловежской пушче богатейшим уникальным природным генетическим ресурсом европейского масштаба?

Литература

1. Гончаренко Г. Г., Падутов А. Е., Падутов В. Е., Силин А. Е., Болсун С. И. Определение генетического разнообразия основных лесообразующих и редких древесных видов ГНП "Беловежская пушча" / Сохранение биологического разнообразия лесов Беловежской пушчи. Каменюки–Минск, 1996. С. 141–160.

2. Гончаренко Г. Г., Савицкий Б. П. Популяционно-генетические ресурсы пихты белой в Беларуси. Гомель: ИЛ НАУБ, 2000. 122 с.

3. Стрелков А. З., Романюк И. Г., Дворак Л. Е. Состояние и перспективы воспроизводства и охраны пихты белой (*Abies alba* Mill.) в Беловежской пушче / Сохранение биологического разнообразия лесов Беловежской пушчи. Каменюки–Минск 1996. С. 122–130.

4. Романюк И. Г. Сохранение и восстановление пихты белой (*Abies alba* Mill.) в Беловежской пушче / Лесная наука на рубеже XXI века. Сб. науч. тр. Ин-та

леса НАН. Гомель. 1997. Вып. 46. С. 99–101.

5. Шкутко Н. В., Мартинович Б. С., Пихта белая в Белоруссии/ Дендрология и лесоведение. Мн: Наука и техн., 1967. С. 77–81.

6. Mejnartowicz L. Cisovka — the relic population of *Abies alba* and its relationship to man-made silver-fir stands in Bialowieza primeval forest// Acta Soc. Bot. Poloniae 1996 V. 65. No. 3-4. P. 319-328.

7. Goncharenko G.G., Padutov A.E., Padutov V.E., Silin A.E., Bolsun S.I. Genetic diversity in selected key forest species in the Belovezhskaya Pushcha National Park// Belovezhskaya Pushcha Forest Biodiversity Conservation. - Minsk, 1997. Pp.156-167.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Указатель латинских видовых названий древесных пород

Хвойные виды

Род *Abies*

- A. alba* Mill. — 9, 12–15, 35, 37–44, 49, 50, 52, 54–63, 65, 71, 74–83, 85–88, 90, 91, 94–96, 100, 104
A. balsamea (L.) Mill. — 41, 69, 71
A. borisii-reges Mattf. — 41, 86, 88, 96
A. bornmulleriana Mattf. — 87, 88, 95
A. cephalonica Loud. — 86, 87, 96
A. equi-trojani Aschers. et Sint. — 87, 88, 95
A. fraseri (Pursh) Poir. — 41, 68
A. gracilis Kom. — 87, 88
A. koreana Wils. — 88
A. mayriana Miyabe et Kudo — 87, 88
A. nebrodensis (Lojac.) Mattei. — 86
A. nephrolepis Maxim. — 41, 68, 69, 71, 88, 89, 90, 91, 94, 96, 98
A. nordmanniana (Stev.) Spach. — 41, 43, 68, 86, 87, 88, 90, 91, 94, 96, 98
A. pinsapo Boiss. — 41
A. recurvata Mast. — 90
A. sachalinensis (Fr. Schmidt) Mast. — 68, 69, 71, 87, 89, 91, 94, 96
A. semenovii B. Fedtsch. — 41, 68–71, 89, 91, 94–96, 98
A. sibirica Ledeb. — 37, 41, 68, 71, 89, 91, 94–96, 98
A. sikokiana Nakai — 88
A. veitchii Lindl. — 88
A. wilsonii Miyabe et Kudo — 87

Род *Picea*

- P. abies* (L.) Karst. — 9, 62
P. glauca (Moench.) Voss. — 76

Род *Pinus*

- P. attenuata* Lemm. — 76
P. halepensis Mill. — 70
P. jeffreyi Grev. et Balf. — 76
P. monticola Dougl. — 76
P. mugo Turra — 62
P. muricata D. Don. — 76
P. ponderosa Dougl. ex Laws. — 76
P. pungens Lamb. — 76

- P. radiata* D. Don. — 76
P. resinosa Ait. — 70
P. sylvestris L. — 62
P. torreyana Parry ex Carr. — 70

Лиственные виды

Род *Acer*

- A. platanoides* L. — 9

Род *Alnus*

- A. glutinosa* (L.) Gaertn — 9

Род *Betula*

- B. pendula* Roth. — 9
B. pubescens Ehrh. — 9

Род *Carpinus*

- C. betulus* L. — 9

Род *Fraxinus*

- F. excelsior* L. — 10

Род *Populus*

- P. tremula* L. — 9

Род *Quercus*

- Q. robur* L. — 9

Род *Salix*

- S. caprea* L. — 10

Род *Sorbus*

- S. aucuparia* L. — 10

Род *Tilia*

- T. cordata* Mill — 9

Род *Ulmus*

- U. laevis* L. — 9
U. scarba Mill. — 9

Содержание

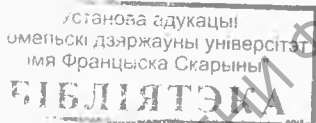
Предисловие научного редактора	6
Глава 1. Характеристика природной популяции пихты белой в Беловежской пушке	9
Глава 2. Методический подход к исследованию популяционно- генетических ресурсов хвойных	17
Выбор метода	17
Этапы электрофоретического анализа изоферментов	26
Глава 3. Электрофоретический анализ и генетический контроль ферментных систем пихты белой	35
Глава 4. Генетическая структура пихты белой в Беловежской пушке и других популяциях северо-восточной части ареала	49
Генетический анализ деревьев пихты белой в изолированной природной популяции Беловежской пушки	49
Сравнительный анализ генетической структуры пихты белой в Беловежской пушке и других природных популяций северо-восточной части ареала этого вида	54
Глава 5. Уровень генетической изменчивости у пихты белой в природных популяциях северо-восточной части ареала	65
Глава 6. Оценка подразделенности и потока генов у пихты белой в популяциях северо-восточной части ареала	74
Глава 7. Генетическая дифференциация в восточноевропейских популяциях пихты белой	80
Глава 8. Появление пихты белой в Европе и ее эволюционно- филогенетические взаимоотношения с пихтами Палеарктики	85

Глава 9. Как сохранить генофонд белорусской популяции пихты белой для последующих поколений	103
Указатель латинских видовых названий древесных пород	108

C o n t e n t s

Introduction	6
Chapter 1. Biological characteristics of natural population of silver fir from Belovezhskaya Pushcha	9
Chapter 2. A modern methods for investigations of genetic population resources of coniferous tree species	17
Choice of method	17
Stages of isozyme electrophoresis	26
Chapter 3. Electrophoretic analysis and genetic control of enzymes systems of silver fir	35
Chapter 4. Genetic structure of silver fir from Belovezhskaya Pushcha and some other East European populations	49
Genetic analysis of silver fir trees from isolated natural population of Belovezhskaya Pushcha	49
Comparative analysis genetic structure of silver fir in Belovezhskaya Pushcha and other East European populations	54
Chapter 5. Level of genetic variability in Easteuropean natural populations of silver fir	65
Chapter 6. Differentiation and gene flow among Easteuropean natural populations of silver fir	74

Chapter 7. Genetic distance between Easteuropean natural populations of silver fir	80
Chapter 8. Taxonomic, evolutionary and phylogenetic relationships between firs of the Palaearctic and migration silver fir in Europe	85
Chapter 9. How to organise conservation of gene pools of silver fir natural population in Belarus	103
Latin index of trees species	108



Учебное издание

Гончаренко Григорий Григорьевич

**АНАЛИЗ
ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ
(на примере пихты белой в Беларуси)**

Учебно-методическое пособие



Ответственный редактор
академик *Л. В. Хотылева*

Лицензия ЛВ № 357 от 12.02.99. Подписано в печать 09. 10. 02.

Формат 60×90 $\frac{1}{16}$. Бумага мелованная. Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л. 6,5. Уч.-изд. л. 5,8. Тираж 200 экз. Заказ № 226.

Учреждение образования «Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины»

2466999, Гомель, ул. Советская 104.

Отпечатано на ризографе с оригинала-макета автора

Редакционно-издательский отдел 246699, Гомель, Песина, 80.