

На правах рукописи



ГАБИТОВА АЙГУЛЬ АЙДАРОВНА

**ДУБ ЧЕРЕШЧАТЫЙ (QUERCUS ROBUR L.) НА ЮЖНОМ УРАЛЕ:
ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУК-
ТУРЫ.**

Специальности:

03.02.08-Экология (биологические науки) и 03.02.07 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

УФА – 2012

Работа выполнена на кафедре лесоводства и ландшафтного дизайна
ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»

Научный руководитель:	Доктор биологических наук, профессор Янбаев Юлай Аглямич
Научный консультант:	Доктор биологических наук, доцент Боронникова Светлана Витальевна
Официальные оппоненты:	Доктор биологических наук, профессор Путенихин Валерий Петрович Доктор биологических наук, профессор Усманов Искандер Юсуфович
Ведущая организация:	ФГБУН Институт экологии Волжского бассейна РАН

Защита состоится «18» мая 2012 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г.Уфа, Проспект Октября, 69. Тел./факс (347) 235-53-62. E-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии УНЦ РАН, с авторефератом – в сети Интернет по адресу <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ.

Автореферат разослан «16» апреля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Уразгильдин Р.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Внутри- и межпопуляционные взаимодействия растений играют ключевую роль в динамике во времени и в пространстве генофондов (Slatkin, 1987) и, через ее регуляцию, в формировании устойчивости на популяционном уровне к экологическим факторам среды. Это положение особенно актуально для видов на границах ареалов, где условия среды для них экологически более экстремальны. Здесь из-за небольшой численности популяции больше подвержены к действию дрейфа генов и инбридинга, чувствительны к эрозии генофонда (Geber, 2008). Возможность противодействия этим неблагоприятным явлениям определяется способностью популяционных систем поддерживать оптимальный уровень внутривидовой пространственной подразделенности (Алтухов, 1995). Новые комбинации генотипов, образующиеся на границах ареалов, могут позволить видам быстрее эволюционировать и дать дополнительные возможности для адаптации и выживания (Petit et al., 2008). Данный процесс в значительной степени определяется эффективностью межпопуляционного генетического потока (Rousseau et al., 2008).

Популяционная структура дуба черешчатого (*Quercus robur* L. (Fagaceae)) исследована на большей части ареала и достаточно детально (Ducouso, Vordacs, 2004). Однако на Южном Урале, где проходят его восточная граница (Семериков, 1981), факторы формирования и поддержания генофонда вида практически не изучены (Яковлев, Клейншмит, 2002), особенно с применением современных и информативных молекулярно-биологических методов (Редькина и др., 2008). Данная проблема не позволяет научно обоснованно разрабатывать системные меры для повышения устойчивости дубрав к неблагоприятным экологическим факторам, оценить эколого-генетические последствия наблюдающейся в последние десятилетия деградации дубняков (Григорьев и др., 2000), сохранять и рационально использовать на популяционной основе генофонд вида (Янбаев и др., 2002), совершенствовать в регионе лесосеменное и лесокультурное дело.

Цель исследований - эколого-генетический анализ популяционной структуры дуба черешчатого на границах его ареала на Южном Урале и комплекса факторов, ответственных за формирование и поддержание его генофонда.

В связи с ней решались следующие задачи:

1) исследовать генетическое разнообразие популяций из различных природно-климатических зон региона и экологических условий местобитаний;

2) сравнить структуру популяций, расположенных в местообитаниях, типичных для вида, и экологически пессимальных условиях среды;

3) исследовать роль генетически реализованной миграции пыльцы на дальние расстояния в формировании и поддержании генетического разнообразия популяционных структур;

4) провести анализ влияния особенностей семенного возобновления на формирование генотипического состава в насаждениях.

Научная новизна. Впервые с применением комплекса биохимических и

молекулярно-генетических методов (аллозимных, ISSR- и микросателлитных локусов), современного научного оборудования и системы математических методов обработки результатов экспериментов изучена популяционная структура дуба черешчатого в восточной части его ареала. Установлено, что на Южном Урале генетическая дифференциация популяций из характерной для вида экологической среды обитания сравнительно невысока и обусловлена приуроченностью к крупным геоморфологическим образованиям и зонам растительности. Популяции из экологически экстремальной (пессимальной) для вида среды обитания генетически подразделены в большей степени. Относительно высокое генетическое разнообразие краевых популяций, в том числе расположенных вне ареала, формируется за счет изменчивого по годам генетически реализованного переноса пыльцы на дальние расстояния. Динамика генетической структуры отдельных популяций в пространстве в существенной степени обусловлена особенностями семенного возобновления. Полученные результаты не только выявляют эколого-генетические факторы формирования популяционных структур дуба черешчатого на географической и экологической границах ареала, но и расширяют теоретические представления об адаптации древесных растений к экстремальным экологическим факторам среды обитания с использованием популяционных механизмов.

Практическая значимость. Результаты исследований и практические рекомендации предлагаются для использования Федеральным агентством лесного хозяйства РФ, научными учреждениями, высшими учебными заведениями в их деятельности, в т.ч. для разработки системы мер для повышения устойчивости дубрав и адаптации дуба черешчатого к факторам среды, для разработки программ сохранения и рационального использования генофонда вида на восточной части ее ареала, совершенствования лесосеменного и лесокультурного дела. Теоретические и практические результаты диссертационной работы могут быть рекомендованы для повышения уровня подготовки бакалавров по направлениям «Биология», «Экология», «Генетика» и «Лесное дело», а также магистров и научно-педагогических кадров высшей квалификации.

Организация исследований. Работа выполнена в 2008-2012 г. на кафедре лесоводства и ландшафтного дизайна ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» (БГАУ). Исследования с применением изоферментного анализа проводили в лаборатории биоразнообразия научно-образовательного центра БГАУ, с использованием ISSR-метода анализа ДНК - в лаборатории молекулярной биологии и генетики Естественно-научного института ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ЕНИ ПГНИУ). Изучение микросателлитных локусов проведено в лабораториях Института лесной генетики Федерального министерства продовольствия, сельского хозяйства и защиты потребителей Германии. Диссертационная работа выполнена в рамках плановых тем научно-исследовательских работ ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, а также по Программе сотрудничества в сфере аграрных исследований между ФРГ и РФ (2009-2011 и 2012-2013 гг., проект № 3/07 «Oekologisch-genetische

Untersuchungen im Hinblick auf Biodiversitaet und Monitoring»), по проекту «Efficient long-distance gene flow into an isolated relict oak stand beyond the eastern range margin of *Quercus robur* L.» (2007-2009 гг.), поддержанном указанным выше министерством ФРГ, при поддержке грантов Ассоциации «Агрообразование» (тема ««Экологические и генетические исследования биологического разнообразия дуба черешчатого на границах ареала (на примере Южного Урала)»», 2010 г.), Института фон Тюнена Федерального исследовательского института сельскохозяйственных земель, лесоводства и рыболовства ФРГ (тема «Identifizierung von Holzherkünften», 2011 г.), Федеральной лесной службы США, выделенного на выполнение консорциумом исследователей из России (Башкирский ГАУ), США, Германии, Австралии и Сингапура проекта «Supporting a robust and reliable timber supply with cutting-edge technology» (2012-2014 гг.).

Личный вклад автора состоит в разработке программы исследований согласно поставленным задачам работы, в выборе объектов и методов, в проведении полевых и лабораторных исследований, в обработке и интерпретации полученных результатов, в их сопоставлении с литературными данными, в подготовке рукописей диссертации и ее автореферата. Подготовка публикаций осуществлена самостоятельно или при активном участии автора диссертационной работы.

Апробация работы. Основные результаты и положения работы были представлены и обсуждались на 12 научных и научно-практических конференциях. В их числе 6 международных (Молодежная наука и АПК - проблемы и перспективы: Уфа, 2010; Состояние, проблемы и перспективы развития АПК: Уфа, 2010; ЕС-Россия - 7-я Рамочная программа в области биотехнологии, лесного, рыбного хозяйства и пищи: Уфа, 2010; Синтез знаний в естественных науках: Пермь, 2011; Проблемы популяционной и общей генетики: Москва, 2011; Третье международное совещание по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири: Красноярск, 2011) и 6 всероссийских (Актуальные вопросы современной науки и образования: Сибай, 2010; Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий: Оренбург, 2010; Агрокомплекс-2010: Уфа, 2010; Агрокомплекс-2011: Уфа, 2011; Научное обеспечение инновационного развития АПК: Уфа, 2011, Агрокомплекс-2012: Уфа, 2012) научных форумов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения и выводов. Она изложена на 152 страницах машинописи, содержит 13 таблиц и 37 рисунков. Список литературы включает 284 источника, из которых 219 - иностранных.

Благодарности: директору Института лесной генетики Федерального Министерства продовольствия, сельского хозяйства и защиты потребителей Германии д-ру Б. Дегену за предоставленную возможность исследования микросателлитных локусов в лабораториях института; его сотруднику д-ру Ю. Бушбом за организацию выполнения экспериментов и консультации; сотруд-

никам лаборатории «Молекулярной биологии и генетики» ЕНИ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», содействовавшим в постановке ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК дуба черешчатого; аспирантам кафедры лесоводства и ландшафтного дизайна Башкирского ГАУ за помощь в сборе растительного материала.

ГЛАВА 1. ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИДОВ *QUERCUS L.*

Проведен анализ отечественных и зарубежных работ по изучению популяционной структуры с применением молекулярно-генетических маркеров у видов *Quercus L.* Сделан вывод, что выявленная противоречивость результатов вызвана недостаточным учетом воздействия на генофонды комплекса факторов (в первую очередь экологических), а также применением ограниченного круга методов молекулярно-генетического анализа популяций, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. В условиях Западной Европы, где исследования популяционной биологии *Quercus L.* проводятся все возрастающими темпами, дубовые леса в последние столетия деградируют из-за их хозяйственного использования. По этим причинам остается трудно достижимым выяснение популяционных механизмов, ответственных за выживание и адаптацию дубов в условиях усиления антропогенного пресса на природу и в экологически экстремальной среде. На многие такие вопросы можно дать ответ лишь при изучении популяций, мало нарушенных человеком, например, в условиях России, где на восточных границах ареала вида сохранились автохтонные насаждения. К сожалению, проведенные в этих условиях исследования единичны (Янбаев и др., 2002; Яковлев, Клейншмит, 2002; Редькина и др., 2008). С учетом проведенного анализа литературы, имеющихся и большей частью нерешенных вопросов и проблем разработан план работы, осуществлен подбор методов, адекватных поставленным цели и задачам.

ГЛАВА 2. РЕГИОН, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Район проведения исследований охватывает лесостепную (Предуралье), степную (Зауралье, юг Зилаирского плато) и горно-лесную (низко- и среднегорья южно-уральских хребтов) зоны Южного Урала (Попов, 1980) – основную часть ареала дуба черешчатого на восточной его границе размером около 650 на 400 км (север-юг и восток-запад, соответственно). В диссертации по работам (Крашенинников, 1939; Колесников, 1969; Горчаковский, 1972; Кадильников, Тайчинов, 1973; Попов, 1980; Мукатанов 1986 и др.) приведено описание природно-климатических условий и растительности региона, показано высокое разнообразие лесных экосистем с участием дуба черешчатого.

Приведено описание биоэкологических свойств *Quercus robur L.* и состояния его насаждений на Южном Урале. Здесь вид обитает на восточной границе ареала, имеет сложную историю расселения, существует в большом экологическом спектре местообитаний, его популяции в различной степени затронуты неблагоприятными климатическими и экологическими (природными и антропогенными) воздействиями. Это обстоятельство может влиять на уровни гене-

тического разнообразия и дифференциации популяций. Однако, мало известно - в какой степени комплекс этих процессов повлиял на генофонд дуба черешчатого на его восточной границе ареала?

В пределах всей исследованной части ареала дуба черешчатого в разных растительных зонах и экологических условиях были заложены 16 пробных площадей (рис. 1). В каждой из них случайным образом были отобраны в среднем по 32 дерева генеративного возраста, с которых были собраны растительные образцы (почки) для лабораторного анализа.

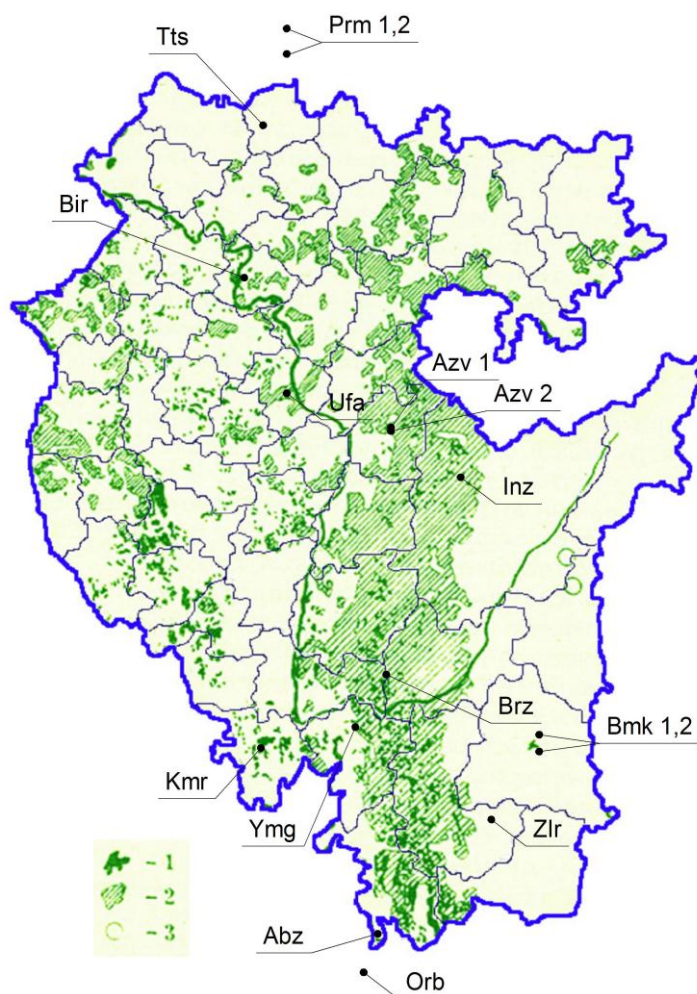


Рис. 1. Схема размещения выборок *Q. robur*

Примечание: 1, 2 и 3 – насаждения с доминированием, участием дуба черешчатого и с его единичными деревьями, соответственно.

Для анализа изоферментов использовали разработанную ранее методику (Редькина, 2008). Разделение аллозимов осуществляли с использованием полиакриламидного гель-электрофореза в 7,5 %-ном щелочном геле (Ornstein, 1964; Davis, 1964). Гистохимическое выявление ферментативной активности в гелях провели по стандартным методикам (Корочкин и др., 1977). Обозначение ферментов и локусов осуществляли согласно одной из номенклатур (Prakash et al., 1969). Исследованы полиморфные локусы *Skdh-1*, *Fdh-1*, *Aap-1*, *Lap-2* и *Dia-1*, кодирующих изоферменты шикиматдегидрогеназы (SKDH, E.C.

1.1.1.25), формиатдегидрогеназы (FDH, 1.2.1.2.), аланинаминопептидазы (AAP, 3.4.11.1.), лейцинаминопептидазы (LAP, 3.4.11.1.) и диафоразы (DIA, E.C. 1.6.4.3.). Генетический контроль наследования этих ферментов исследован при анализе потомства дуба от межвидовых скрещиваний (Muller-Starck et al., 1996), а изменчивость локуса димерной FDH - при помощи статистических методов (Редькина и др., 2008). Для анализа популяционных структур использованы показатели, определяемые компьютерной программой BIOSYS-1 (Swofford, Selander, 1981), в том числе частота аллелей, число аллелей на локус A , доля полиморфных локусов P , наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность (H_o и H_e , соответственно), показатель межпопуляционной подразделенности F_{ST} и индекс фиксации (коэффициент фиксации) F (Wright, 1969), генетическое расстояние М. Нея D (Nei, 1972). При определении статистической достоверности различий выборок, наблюдаемых и теоретически ожидаемых по правилу Харди-Вайнберга частот генотипов, использованы тесты χ^2 и G , а также при необходимости осуществлялось объединение генотипов в отдельные классы (Животовский, 1981). Эти вычисления осуществлены с использованием программы GSED (Gillet, 1998). С ее помощью выборки также сравнивались по генотипическим частотам, определялись параметры внутривидового разнообразия $v(p)$, популяционной дифференциации δ_T , генетическое расстояние Грегориуса (Gregorius, 1974, 1978). С применением этой программы определялись многолокусные генотипы отдельных особей.

Молекулярно-генетический анализ проведен в лаборатории молекулярной биологии и генетики ЕНИ ПГНИУ с использованием ISSR- (Inter Simple Sequence Repeats, Zietkiewicz et al., 1994)-метода с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК из почек дуба черешчатого выделяли методом А.М. Торрес (Torres et al., 1993). Концентрацию и спектральную характеристику ДНК определяли на приборе SpectrofotometrTM NanoDrop 2000 («Thermo scientific», USA). Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ MiniCycler («Bio-rad», США) по стандартной для ISSR-метода программе (Молекулярная генетика..., 2007). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1.7 %-ном агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и сканировали в системе гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», USA). Для определения длин фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы («СибЭнзим-М», Россия) и программу Quantity One («Bio-Rad», USA). Проведен анализ полиморфизма 99 ISSR-PCR маркеров. Для проверки достоверности полученных результатов опыты повторяли не менее трех раз. Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью программы POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1999) и специализированного макроса GenAlEx6 (Peakall, Smouse, 2006) для MS-Excel с определением доли полиморфных локусов P_{95} (Williams et al., 1990), общего числа аллелей (n_a), эффективного числа аллелей (n_e) (Kimura et al., 1964), ожидаемой гетерозиготности (H_e) (Nei, 1987) и коэффициента межпопуляционной подразделенности

G_{ST} . (Nei, 1975). Дендрограммы по ISSR-спектрам были построены при помощи компьютерных программ Treeson 1.3b и POPGENE 1.31.

Исследования микросателлитных локусов проводили в лабораториях Института лесной генетики и селекции Федерального исследовательского центра сельскохозяйственных земель, лесоводства и рыбоводства Германии. ДНК из растительных образцов выделяли по методике (Dumolin et al., 1995). Количество ДНК определяли на биофотометре Eppendorf (Германия). С применением ПЦР-реакции изучали полиморфизм микросателлитных локусов QpZAG112, QrZAG96, QpZAG110, QrZAG11, QrZAG87, QrZAG7, QrZAG20, QrZAG5b и QrZAG65 (Schueler et al., 2003; Testolin et al. 2000; Dirlwanger et al. 2002). Фрагменты анализировали на генетическом анализаторе Megabace (Amersham Biosciences, Великобритания) и с применением MegaBace Fragment Profiler v1.2 (тот же производитель). Для оценки уровня генетического разнообразия у деревьев и зародышей вычисляли параметры A , H_o и H_E (см. выше). Для определения уровня дифференциации популяций применяли показатели F_{ST} и ее стандартизованную величину (Hedrick, 2005), параметры внутривидового разнообразия $v(p)$ и популяционной дифференциации δ_T . Для определения пространственной генотипической структуры популяций (Cliff, Ord, 1981; Epperson, 1991) с применением аллелей микросателлитных локусов использовали программу автокорреляционного анализа SGS (Degen et al., 2001). В качестве меры сходства особей в пределах популяций выбрали расстояние Грегориуса d (1978).

Статистическую обработку данных анализа аллозимных, ISSR- и микросателлитных локусов проводили с использованием также других параметров, процедур и методов (Животовский, 1983, 1990). Статистический анализ различных других вариационных рядов выполнены при помощи программы "STATISTICA 6.0" (версия 6.0.) и MS EXCEL.

ГЛАВА 3. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ПОПУЛЯЦИЯХ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

Во всех выборках при изучении полиморфных аллозимных локусов Skdh-1, Fdh-1, Aap-1, Lap-2 и Dia-1 нами обнаружено 30 аллелей. Выявление генотипов с уникальным (не встречающимся у других особей) набором аллелей показало, что в среднем на одну выборку $94,3 \pm 2,12$ % деревьев обладали отличающимся набором аллозимов. Эта доля варьировала по пробным площадям от 78,1 до 100 (в восьми из четырнадцати изученных популяций) %. В каждой выборке недостаточно точно идентифицированы генотипы лишь 1-2 деревьев (в среднем 5,7 %) на каждой пробной площади. Это демонстрирует относительную информативность использованного нами набора полиморфных аллозимных локусов для генотипирования деревьев.

Анализ таблицы 1 показал, что географически краевые популяции имеют в среднем большее аллельное разнообразие, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность у них выше, чем в популяциях, расположенных в типичных для вида экологических условиях (группа 2). В группе 1 значение среднего коэффици-

ента инбридинга меньше. Популяции из экологически пессимальных условий среды (группа 3) уступают им по уровню изменчивости и полиморфизму аллозимных локусов. Снижение соответствующих параметров получены у них в основном за счет выборки Brz, где полиморфными были лишь два локуса. Без учета данной популяции вычисленные показатели генетической изменчивости группы 3 ($A=3,00\pm 0,60$, $H_E=0,377\pm 0,018$, $H_O=0,309\pm 0,015$, $\bar{F}=+0,180$) и остальных популяций (в том числе представляющих географически изолированные малые насаждения Bm1,2 с крайне низкой численностью особей) становятся сопоставимыми. Этот феномен противоречит теоретическим представлениям, что наибольшее генетическое разнообразие складывается в центральных популяциях. В качестве причины низкого полиморфизма малой по объему популяции Brz, расположенной на экологическом краю ареала и имеющую у особей нехарактерную для вида стланиковую форму, может быть фенологическая изоляция деревьев местообитания, приводящая к ограничению генетического потока извне.

Выявленный относительно высокий полиморфизм не является характерным лишь для аллозимных локусов. Анализ полиморфизма ISSR-PCR маркеров показал, что в выборке Bm1 имеется $1,31\pm 0,47$ аллелей на локус, в то время в популяциях Azv1, Orb, Ufa, Tts и Inz значения параметра варьируют от $1,39\pm 0,491$ до $1,60\pm 0,493$ (в среднем $1,47\pm 0,04$, различия с Bm1 в 12 % статистически недостоверны). Это заключение сделано при анализе 99 амплифицированных фрагментов ДНК, среди которых 67 были полиморфными ($P_{95}=0,677$). Самая высокая доля полиморфных ISSR-локусов отмечена в популяции Azv1 ($P_{95}=0,743$), но выборка Bm1 мало уступала по этому параметру как ей, так и другим сравнительно большим по объему популяциям Orb, Ufa, Tts и Inz (рис. 2., см. там также число фрагментов, в т.ч. редких). В Bm1 ожидаемая гетерозиготность составила $H_E=0,076\pm 0,014$, в Inz – $0,091\pm 0,015$, в то время в популяциях Azv1, Orb, Ufa и Tts она варьирует от $0,104\pm 0,011$ до $0,126\pm 0,017$ (то есть не намного выше, с учетом больших объемов популяций).

Аналогичное заключение сделано нами при анализе 9 использованных микросателлитных локусов. Насаждения Bm1 и Bm2, географически изолированные (до ближайших дубрав расстояние не менее 80 км) и имеющие небольшую численность (27 и 7 деревьев генеративного возраста, соответственно), практически не уступают по гетерозиготности ($H_E=0,81\pm 0,03$, $H_O=0,85\pm 0,04$ и $H_E=0,69\pm 0,07$, $H_O=0,75\pm 0,109$, соответственно) двум популяциям дуба черешчатого – из Германии ($H_E=0,81\pm 0,017$ – $0,82\pm 0,19$, $H_O=0,78\pm 0,18$ – $0,81\pm 0,18$) (Бушбом и др., 2010), а также (табл. 2) из контрольного насаждения Azv1 из Южного Урала ($H_E=0,80\pm 0,06$, $H_O=0,85\pm 0,04$). В выборках Azv1 и Bm1 в среднем на локус выявлено редких аллелей $6,88\pm 1,48$ и $4,33\pm 1,19$, соответственно. В насаждении Bm2 редкие аллели не обнаружены. Причиной такого снижения параметра, как и в случае с числом аллелей на локус, может быть малое число деревьев (всего семь особей). В выборке желудей, имеющей больший объем, как будет показано ниже, аллельное разнообразие близко к значению A

в Azv1. Выявленные уровни генетического разнообразия популяции Bm1,2 представляются относительно высокими с учетом крайне малой численности в насаждении материнских деревьев и географической удаленности (не менее 80 км) насаждения от других дубрав.

Таблица 1.

Генетическая изменчивость аллозимных локусов в популяциях дуба черешчатого

Выборки	P , %	A	H_E	H_O	\bar{F}
Группа 1					
Orb ¹	100	3,8	0,454 ± 0,108	0,420 ± 0,105	+0,075
Inz ²	100	3,6	0,395 ± 0,081	0,324 ± 0,051	+0,179
Prm 1,2 ³	100	3,8	0,431 ± 0,079	0,371 ± 0,059	+0,139
В среднем	100	3,7	0,426 ± 0,17	0,371 ± 0,028	+0,129
Группа 2					
Abz ⁴	100	3,0	0,427 ± 0,067	0,422 ± 0,083	+0,012
Zlr ⁴	100	2,8	0,388 ± 0,084	0,329 ± 0,069	+0,152
Kmr ⁴	100	3,4	0,417 ± 0,068	0,387 ± 0,072	+0,071
Ymg ⁴	100	3,2	0,379 ± 0,083	0,394 ± 0,082	-0,039
Azv1 ⁴	100	4,2	0,449 ± 0,087	0,294 ± 0,071	+0,345
Azv2 ⁴	100	4,6	0,458 ± 0,083	0,294 ± 0,047	+0,358
Ufa ⁴	100	2,0	0,294 ± 0,081	0,311 ± 0,084	-0,058
Bir ⁴	100	3,4	0,407 ± 0,087	0,340 ± 0,117	+0,165
Tts ⁵	100	3,2	0,394 ± 0,092	0,303 ± 0,068	+0,231
В среднем	100	3,3	0,401 ± 0,016	0,342 ± 0,016	+0,147
Группа 3					
Inz ²	100	3,6	0,395 ± 0,081	0,324 ± 0,051	+0,179
Bmk 1,2	80	2,4	0,359 ± 0,128	0,294 ± 0,097	+0,181
Brz	40	2,0	0,216 ± 0,133	0,127 ± 0,079	+0,412
В среднем	73	2,7	0,323 ± 0,055	0,248 ± 0,061	+0,180

Примечания. Группа 1: географически краевые популяции на северо-востоке (¹), востоке (²) и юго-востоке (³) ареала; группа 2 – популяции широколиственной (⁴) и хвойно-широколиственной (⁵) зон; Группа 3 - насаждения из экологически пессимальных условий среды, в том числе географически изолированные и малые по объему дубравы (Bmk 1,2 и Brz). P - доля полиморфных локусов, A - число аллелей на локус, H_O и H_E - наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, соответственно), F - коэффициент инбридинга.

ГЛАВА 4. МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

Определение параметров F -статистики Райта показало, что по всем использованным полиморфным аллозимным локусам в среднем 90,3 % всей генетической изменчивости популяций относится к ее внутривыборочной составляющей. Межвыборочная дифференциация ($F_{ST}=0,097$) дуба черешчатого Южного Урала выражена больше, чем межпопуляционная подразделенность западно-европейских популяций (Müller-Starck et al., 1993). Вычисление генети-

ческой дистанции М. Нея показало, что максимальные различия южно-уральских популяций наблюдаются на сравнительно высоком уровне $D=0,117$. Относительно высокая межпопуляционная изменчивость дуба черешчатого на Южном Урале может быть обусловлено несколькими причинами. Исследованные насаждения расположены в экологически различающихся местообитаниях. Формирование дубрав в регионе в последнее геологическое время могло происходить за счет разных генофондов – из локальных рефугиумов и мигрантов из убежищ Поволжья. В последние десятилетия наблюдается массовое, но неравномерное по региону, усыхание дуба из-за чередующихся экстремально холодных зим и последующих всплесков численности энтомовредителей дуба.

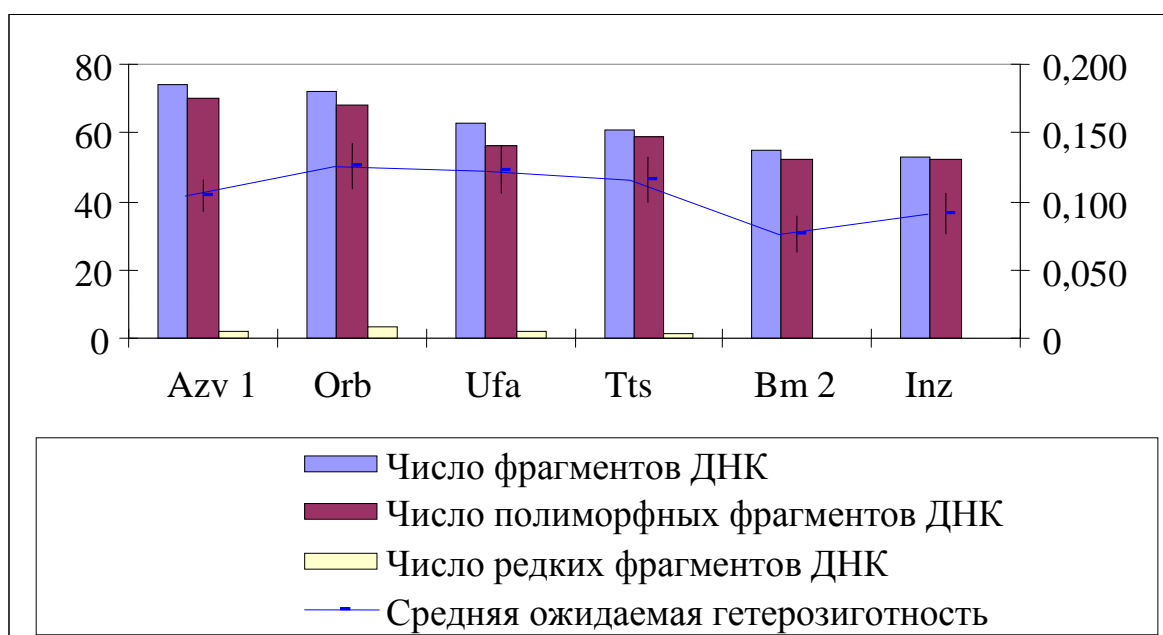


Рис.2. Показатели генетического разнообразия популяций *Q. robur* на основании полиморфизма ISSR-PCR маркеров

Таблица 2.

Полиморфизм и изменчивость микросателлитных локусов
в популяциях разного объема дуба черешчатого

Локусы	A			H_E			H_O		
	Azv1	Bm1	Bm2	Azv1	Bm1	Bm2	Azv1	Bm1	Bm2
QpZAG112	16 (8)	13 (8)	4 (0)	0,881	0,815	0,459	0,895	0,833	0,429
QrZAG96	8(6)	5(1)	2(0)	0,405	0,566	0,245	0,417	0,556	0,286
QpZAG110	8(3)	7(0)	5(0)	0,628	0,836	0,845	0,667	0,878	1,000
QrZAG11	19(10)	12(7)	7(0)	0,903	0,826	0,796	0,972	0,889	1,000
QrZAG87	11(4)	10(5)	4(0)	0,861	0,787	0,612	1,000	0,778	0,429
QpZAG112	11(3)	8(1)	8(0)	0,876	0,824	0,827	1,000	0,889	1,000
QrZAG96	12(5)	7(1)	5(0)	0,816	0,812	0,662	0,939	0,778	0,714
QpZAG110	26(17)	16(9)	9(0)	0,939	0,907	0,857	0,889	1,000	0,857
QrZAG11	15(6)	13(7)	8(0)	0,900	0,873	0,864	0,846	1,000	1,000
В среднем	14,00	10,11	5,78	0,801	0,805	0,685	0,847	0,845	0,746
$\pm m$	1,93	1,21	0	0,058	0,032	0,072	0,064	0,045	0,097

Примечания: в скобках приведено число аллелей с частотой менее 5 %, m - ошибка среднеарифметических значений. См. также примечания таблицы 2.

Основной вклад в дифференциацию популяций вносят Inz, Brz и Vm1/Vm2, расположенные в пессимальных экологических условиях обитания и генетически отличающиеся на относительно высоком уровне как друг от друга ($D=0,087$), так и других популяций. Без их учета наблюдается снижение генетической дистанции между остальными выборками до $D=0,074$. Оставшиеся популяции объединились (рис. 3) в три группы кластеров, условно отнесенных нами к северным (Prm1, Prm2, Tts), центральным (Bir, Ufa, Azv1, Azv2, Ymg) и к южным (Kmr, Zlr, Abz, Orb) дубравам. При этом в двух последних группах наблюдается закономерная структурированность генетической изменчивости – коэффициент корреляции между генетической дистанцией и географическим расстоянием является статистически достоверным ($r=0,34$, $p<0,05$). Северные и центральная насаждения расположены в зонах хвойно-широколиственных и широколиственных лесов Башкортостана, соответственно. Южные популяции расположены вне этих зон на Зилаирском плато и прилегающей южнее лесостепи. Из этой закономерности выбивается лишь выборка Inz, представляющая дубравы из экологического и географического края ареала, расположенных на стыке хвойно-широколиственной и широколиственной зон растительности. В целом же генетическая дифференциация дубрав, произрастающих в относительно характерных для дуба черешчатого экологических условиях, по аллозимным локусам в целом соответствует известным представлениям (Семериков, 1981) об истории расселения вида на Южном Урале, приуроченности вида к отдельным растительным и природно-климатическим зонам и крупным геоморфологическим образованиям.

В среднем для одного ISSR-локуса величина показателя межпопуляционной подразделенности G_{ST} составила $0,530 \pm 0,032$. Различия в абсолютных величинах параметров G_{ST} и F_{ST} по аллозимным (см. выше) и ISSR-локусам, как показало сравнение авторских данных и результатов, известных в научной литературе, может быть связано с кодированием ими функционально разных частей генома (Янбаев и др., 2008). Тем не менее, метод позволил подтвердить общее заключение, сделанное при анализе аллозимов. Два насаждения Vm1 и Inz из экологически пессимальных условий дифференцированы генетически практически на том же уровне ($G_{ST}=0,557$), как и популяции Orb, Azv1, Ufa и Tts ($G_{ST}=0,615$), находящиеся на значительно большем удалении друг от друга, принадлежащие разным зонам растительности и расположенные на разных крупных геоморфологических образованиях Южного Урала. Более того, выборка Inz существенно отличается по частотам ISSR-фрагментов и от находящейся поблизости (чуть более 60 км по прямой) популяции Azv.

Для проверки гипотезы, что географически изолированные малые по численности древостоя дубравы, отличающиеся по генотипической структуре от больших по объему популяций по данным аллозимных и ISSR-локусов, должны быть генетически дифференцированы и по аллелям микросателлитных локусов, нами с использованием последних сравнены выборки Vm1 и Azv1. Установле-

но, что генетическое расстояние М. Нея для пары Bm1/Azv1 составило относительно высокое значение $D=0,226$. В этом отношении генотипический состав в выборке Azv1 и в двух насаждениях Германии (см. Бушбом и др., 2010) ближе, чем генетическая дифференциация популяций Южного Урала, отличающиеся экологическими условиями обитания и численностью особей.

ГЛАВА 5. ВНУТРИ- И МЕЖПОПУЛЯЦИОННЫЙ ПОТОК ГЕНОВ КАК ФАКТОР ФОРМИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

На основе результатов, изложенных в Главах 3 и 4 выдвинута гипотеза, что популяции, расположенные на экологическом и географическом краях ареала и обладающие относительно малыми объемами, но сравнительно высоким генетическим разнообразием, для предотвращения деградации генофондов из-за дрейфа генов и инбридинга должны обладать механизмами, препятствующими этим силам. Анализ литературы позволил выдвинуть предположение, что основной действующей силой при этом может быть межпопуляционный поток генов, реализуемый посредством распространения пыльцы. Однако известные в научной литературе представления об эффективности дальнего переноса пыльцы и возможностях ее генетической реализации противоречили данной идее, в частности, тому, что они могут быть существенным фактором формирования популяционной структуры в таких дубравах, как Bm, географически изолированных от других дубняков расстоянием около 80 км.



Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе генетических расстояний D между популяциями дуба черешчатого по аллозимным локусам

Для проверки или опровержения этой гипотезы использованы микросателлитные локусы. При этом использован оригинальный методический подход – применение в качестве модельных объектов географически изолированных малых популяций, в которых возможно генотипирование всех имеющихся деревьев и необходимого числа зародышей. Исследование проведено на примере насаждений из Башкирского Зауралья Vm1 и Vm2, расположенных на расстоянии минимум 80 км от основной части дубняков Южного Урала и насчитывающих всего 7 и 27 деревьев репродуктивного возраста, соответственно. На основе генотипирования семи плодоносящих деревьев и их зародышей в желудях урожая двух лет на пробной площади Vm2 были определены все возможные генетические комбинации у потомства для анализа трех сценариев: 1) образование потомства происходит только за счет собственной пыльцы; 2) формирование генотипов зародышей осуществляется дополнительно пыльцой, поступающей из древостоя Vm1; 3) в насаждении обнаруживаются аллели, отсутствующие в Vm1 и Vm2.

Показано, что поступление пыльцы из неизвестных источников обусловило появление аллелей, не встречающихся во всех возможных родительских парах в Vm1 и Vm2, у 41 % исследованных желудей. Таким образом, причиной относительно высокой генетической изменчивости краевых популяций дуба черешчатого на Южном Урале (не только Vm, но и других) может быть генетически эффективно реализованный поток пыльцы на дальние расстояния.

Установлено, что комплекс экологических факторов (в первую очередь погодные условия и ветровой режим), с учетом чувствительности к ним пыльцы черешчатого, может модулировать генетическую реализацию дальнего транспорта пыльцы в географически изолированные насаждения дуба черешчатого. Доказательства получены при сравнении полиморфизма микросателлитных локусов зародышей выборки Vm2a (желуди собраны с деревьев) и Vm2b (мумифицированные в земле желуди предыдущего года). В выборке Vm2b число аллелей на локус составляет $A=5,56 \pm 2,36$, ожидаемая гетерозиготность $H_E=0,63 \pm 0,21$, наблюдаемая – $H_O=0,74 \pm 0,27$. Для желудей следующего года плодоношения получены следующие данные. Число аллелей на локус было почти в два раза больше ($A_L=10,22 \pm 2,57$), хотя значения гетерозиготности отличались незначительно ($H_E=0,77 \pm 0,16$, $H_O=0,69 \pm 0,15$). Выявленные различия позволили сделать заключение, что для генетически эффективного транспорта пыльцы, видимо, необходимо благоприятное стечение погодных и климатических условий.

Данные, изложенные в Главах 3 и 4, ставят вопрос - по какой причине малые и географически изолированные популяции генетически сравнительно сильно дифференцированы от больших по объему популяций? Для ответа на него нами проверена гипотеза, что особенности семенного возобновления дуба черешчатого являются для них существенным фактором увеличения генетического разнообразия. В этих целях в насаждении Vm1 проведен основанный на GIS-технологиях и симуляции Монте-Карло автокорреляционный анализ, позволяющий статистически оценить убывание генетического родства пар деревь-

ев с ростом расстояния между ними. При этом сразу три микросателлитных локуса показали феномен «изоляции дистанцией» - генетическое расстояние Г.-Р. Грегориуса статистически достоверно росло с увеличением класса дистанции с 20, 31 и 51 м до 124 -153 м. С этих расстояний на графике-дистогамме линия, показывающая увеличение параметра d , выходит за пределы 95 %-ного доверительного интервала, начиная случайно флуктуировать. Анализ особенностей семенного возобновления дуба черешчатого позволил выбрать наиболее вероятное объяснение этой динамики – гравитационный механизм распространения желудей и с ними материнских аллелей, из-за чего концентрация последних убывает с расстоянием. Малые размеры популяций из экологически пессимальных условий среды должны способствовать этому процессу, так доля каждого дерева-источника семян в образовании общего урожая в этих условиях намного больше, чем в больших по численности древостоях.

ВЫВОДЫ

1) Три разных типа молекулярно-генетических маркеров (аллозимные, ISSR- и микросателлитные локусы) показывают сравнительно высокое генетическое разнообразие дуба черешчатого Южного Урала, в том числе в расположенных в экологически пессимальных условиях среды краевых географически изолированных малых популяциях.

2) Расположенные в типичных для вида условиях среды популяции, по результатам анализа аллозимных локусов, сгруппировались по приуроченности к отдельным зонам растительности Южного Урала и к крупным геоморфологическим образованиям. Выделены северная (зона хвойно-широколиственных лесов на севере Камско-Бельского понижения), центральная (зона широколиственных лесов центральной части Камско-Бельского понижения и низкогорий западного макросклона южно-уральских гор) и южная (граница бореально-лесной и степной зон, юг Зилаирского плато) группы популяций с относительно слабой внутрigrупповой генетической дифференциацией.

3) Основной вклад во внутривидовую пространственно-генетическую дифференциацию дуба черешчатого на Южном Урале вносят малые популяции эколого-географического края ареала, расположенные в экологически пессимальных условиях среды.

4) Генетически реализованный поток пыльцы, переносимой на дальние расстояния, является важным фактором формирования относительно высокого аллельного разнообразия в географически изолированных малых популяциях, снижая вероятность воздействия на их генофонд дрейфа генов и инбридинга.

5) Аллельное разнообразие потомства в краевых малых популяциях существенно варьирует по годам. Наиболее вероятной причиной данного феномена может быть воздействие комплекса экологических факторов (погодные условия, ветровой режим и др.), изменяющее качество пыльцы.

6) Гравитационный механизм распространения семян (желудей) дуба черешчатого в малых по численности деревьях географически изолированных дубравах, создавая в древостоях выраженную пространственно-семейную кластеризацию генотипов, является фактором, ответственным за относительно высокое генетическое своеобразие популяций на экологической и географической границах ареала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Янбаев Ю.А., Габитова А.А., Бушбом Ю. и др. Естественное возобновление дуба черешчатого на северо-восточной границе ареала // Аграрная Россия (специальный выпуск «Актуальные проблемы дендроэкологии и адаптации растений», посвященный 80-летию со дня рождения профессора Ю.З. Кулагина). – 2009. – С. 16-17.
2. Коновалов В.Ф., Янбаев Ю.А., Галлеев Э.И., Саитова Р.М., Габитова А.А. Состояние и перспективы развития селекции древесных растений в Республике Башкортостан // Аграрный вестник Урала. - 2010. - № 3. – С. 98-99.
3. Бушбом Ю., Янбаев Ю. А., Деген Б., Габитова А. А. Динамика генетического разнообразия во времени в изолированной популяции дуба черешчатого *Quercus robur* L. (*Fagaceae*) // Генетика. – 2012. – Т. 48. - № 1. – С. 135-137.
4. Янбаев Ю.А., Габитова А.А., Боронникова С.В. Экологическая обусловленность межпопуляционной генетической дифференциации дуба черешчатого на Южном Урале // Вестник БГАУ. 2012. - № 2. - С. 63-65.

Публикации в других изданиях

5. Габитова А.А. Об естественном возобновлении дуба черешчатого // Молодежная наука и АПК. Проблемы и перспективы: матер. междунар. науч.–практ. конф. – Уфа, 2010 г. – С. 198-200.
6. Садыков Х.Х., Габитова А.А., Янбаев Ю.А. О формировании культур дуба черешчатого // Актуальные проблемы современной науки и образования: материалы всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2010. – С. 170-173.
7. Бушбом Ю., Деген Б., Янбаев Ю.А., Редькина Н.Н. и др. Эффективность генетического потока в изолированные малые популяции дуба черешчатого) // Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий: матер. V всерос. науч.-практ. конф. - Оренбург, 2010. – С. 20-22.
8. Габитова А.А., Ахметов А.Р., Ситдииков М.Р. О сохранении биоразнообразия древесных пород в республике Башкортостан // Состояние, проблемы и перспективы развития АПК: матер. междунар. науч.–практ. конф. - Уфа, 2010 г. - 96-98.
9. Габитова А.А., Янбаев Ю.А., Муллагулов Р.Ю., Редькина Н.Н. и др. Об аллельном разнообразии древесных растений на восточной границе ареала на Южном Урале // ЕС-Россия: 7-я Рамочная программа в области биотехнологии, лесного, рыбного хозяйства и пищи: матер. междунар. науч.–практ. конф. с элементами научной школы для молодежи. - Уфа, 2010. - С. 81-83.
10. Янбаев Ю.А., Габитова А.А. Полиморфизм изоферментов дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) // Научное обеспечение инновационного развития АПК: мат. всерос. науч.-практ. конф. в рамках XX юбилейной специализированной выставки «Агрокомплекс-2010». - Уфа, Башкирский ГАУ. - 2011. – С. 317-319.
11. Габитова А.А., Янбаев Р.Ю. Генетическое разнообразие дуба черешчатого Южного Урала // Агрокомплекс-2011: мат. всерос. науч.-практ. конф. в

рамках XXI международной специализированной выставки. – Уфа, 2011. - 209-211.

12. Садыков Х.Х., Янбаев Ю.А., Габитова А.А., Ахметов А.Р. и др. Эколого-генетические процессы при естественном возобновлении широколиственных лесов Южного Урала // Синтез знаний в естественных науках: матер. межд. науч. конф. – Пермь: Перм. гос. иссл. ун-т., 2011. - Т. 2. – С. 197-200.

13. Габитова А.А., Янбаев Ю.А., Боронникова С.В. Анализ генетического разнообразия дуба черешчатого с применением ISSR-PCR маркеров // Проблемы популяционной и общей генетики: мат. междунар. конф., посвященные памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. - Москва, 2011. – С. 102.

14. Янбаев Ю.А., Бушбом Ю., Деген Б., Габитова А.А. Формирование генетического разнообразия изолированных малых популяций дуба черешчатого на Южном Урале // Проблемы популяционной и общей генетики: мат. междунар. конф., посвященные памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. - Москва, 2011. – С. 123.

15. Габитова А.А., Янбаев Ю.А. Экология семенного размножения дуба черешчатого и формирования генотипического состава популяций в пространстве // Агрокомплекс-2012: мат. всерос. науч.-практ. конф. в рамках XXII международной специализированной выставки. - 2012. - С. 42-44.