

На правах рукописи



Карпеченко Никита Александрович

**АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ
ПУТЕЙ И ИНВЕРТИРОВАННЫХ ПОВТОРОВ ДНК В ПОПУЛЯЦИИ
ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ
В ЛЕСОСТЕПИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Специальность 03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор

Попов Василий Николаевич

Официальные оппоненты: Северин Фёдор Фёдорович

доктор биологических наук,
Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии имени
А.Н. Белозерского, лаборатория молекулярной
биологии дрожжей, заведующий

Фоменко Олег Юрьевич

кандидат биологических наук,
ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
ветеринарный институт патологии, фармакологии и
терапии Россельхозакадемии, лаборатория
патобиохимии, заведующий

Ведущая организация: ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии
растений Сибирского отделения РАН

Защита состоится «04» июля 2014 года в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при ФГБОУ ВПО Воронежском государственном университете: 394006, Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке и на сайте <http://www.vsu.ru> ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Автореферат разослан «05» мая 2014 года.

Учёный секретарь диссертационного
совета, доктор биологических наук,
профессор



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последнее время во всем мире важнейшей проблемой становится сохранение биоразнообразия древесных растений. Одним из направлений в решении данной проблемы является изучение биохимико-генетических параметров полиморфизма популяций и их особенностей, которые в значительной мере обусловлены происхождением растений.

Научные основы мониторинга биоразнообразия растений требуют получения количественных оценок популяционно-генетических параметров, что возможно лишь на базе молекулярно-биохимических маркеров. Особый интерес представляют изоферментные маркеры и ДНК-маркеры, которые продолжают оставаться одним из главных инструментов изучения популяционно-генетической структуры, внутри- и межвидовой дифференциации и гибридизации растений [А.К. Экарт и др., 2010].

Анализ изменений, происходящих как в аминокислотной, так и в нуклеотидной последовательности в настоящее время приобретает всё большее значение в популяционно-генетических исследованиях, таких как изучение биоразнообразия видов, выявление субпопуляционных структур внутри одной популяции и путей их миграции [Д.И. Каган и др., 2009].

Изменение аминокислотной последовательности молекулы фермента и, как следствие, образование различных её форм, по мнению ряда авторов, носит адаптационный характер [S.J. Guttman et al., 1989]. Подобные изменения в структуре молекулы фермента могут привести к изменению ряда основных показателей ферментативной реакции, таких как максимальная скорость, сродство к субстрату и т.д., и образованию новых форм данного фермента [В.И. Глазго и др., 1993]. Этот процесс наиболее отчетливо выражен у растений, поскольку они не способны к быстрой смене мест обитания, и поэтому (в процессе эволюции) их основные метаболические пути приспособились к более консервативным условиям обитания. Это является причиной того, что любые значимые изменения окружающей среды в процессе перемещения популяции способны оказывать эффект на аминокислотную последовательность молекулы фермента. Данные изменения могут происходить как по причине образования разных молекул РНК в

процессе альтернативного сплайсинга, так и по причине возникновения мутации в гене, кодирующем фермент [R. Finkeldey et al., 2001].

Известно, что эволюционные процессы и естественный отбор, сопровождающиеся изменением генетического состава популяций и, как следствие, биохимических показателей, формированием адаптаций и видообразованием, направлены на сохранение особей с наиболее удачной комбинацией генов, более приспособленных к условиям обитания. В мировой практике для молекулярно-биологических исследований объектов лесного и сельского хозяйства используют преимущественно ДНК-маркеры. Это ядерные элементы, в основном микросателлиты, так называемые STR-маркеры, или последовательности ДНК, ограниченные инвертированными повторами [В.Н. Калаев и др., 2012].

В настоящее время наиболее острой является проблема сохранения и восстановления биоразнообразия основных лесобразующих пород древесных растений. К таким растениям относится дуб черешчатый (*Quercus robur L.*). Дуб черешчатый – дерево первой величины, достигающее в благоприятных условиях значительных размеров: 35–40 м высоты (изредка до 55 м), диаметр ствола до 2,5 м. Дуб черешчатый характеризуется особенностью метаболизма и биохимического состава древесины. Для него характерна способность синтезировать группу растворимых в воде, сложных по составу органических веществ ароматического ряда, содержащих в составе молекул гидроксильные радикалы фенольного характера. Дуб относится к засухоустойчивым растениям и при этом способен произрастать в условиях повышенной увлажненности [С.Н. Карандина, 1963]. Данные особенности дуба черешчатого позволяют отнести его к группе особо ценных древесных пород растений. Поэтому исследование характера изменения белкового спектра ферментов и молекулярных маркеров, связанного с трансформацией аминокислотного и нуклеотидного состава биополимерных молекул в популяции растений, произрастающих в условиях различных мест обитания, представляет значительный научный и практический интерес.

Изучение полиморфизма белкового спектра и молекулярных маркеров ДНК в популяции древесных растений позволяет решать задачу поиска путей сохранения биоресурсов, предотвращения истощения генофонда, что является актуальной задачей не только биохимии, но и молекулярной биологии.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение изменения белкового спектра ферментов метаболических путей клетки и молекулярных маркеров в популяции древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в условиях разных мест обитания.

Согласно поставленной цели в программу исследований входило решение следующих задач:

1) Изучить полиморфизм белкового спектра ферментов метаболических путей клетки в популяции дуба черешчатого.

2) Определить характер изменения ДНК-маркеров в популяции дуба черешчатого.

3) Провести анализ и определить параметры биохимико-генетической изменчивости популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации.

4) На основе полиморфизма биохимических маркеров провести кластерный анализ и составить карты границ популяционной структуры дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации.

Научная новизна. Научные положения настоящей работы дополняют и расширяют представления о механизмах адаптации растений к различным условиям произрастания, связь данных процессов с изменением биохимических и молекулярно-биологических показателей, что характеризует формирование определенной генетической структуры популяции.

Анализ изменения биохимических и молекулярно-биологических параметров на примере дуба черешчатого, произрастающего в лесостепной зоне европейской части Российской Федерации, показал, что популяция не является абсолютно однородной структурой.

Отклик ферментативной и генетической систем на воздействие изменяющихся параметров окружающей среды активирует адаптационные механизмы, оказывающие влияние на преобразование белкового и генетического состава растительного организма. В зависимости от условий мест произрастания дуба черешчатого формируются группы особей, характеризующиеся более схожим белковым спектром ферментов и молекулярных маркеров, что дает возможность выделять различные экотипы внутри популяции.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные изменения спектра биохимических маркеров представляют особый научный интерес, поскольку дают возможность проводить мониторинг популяционной структуры древесных растений, выявлять происходящие при этом эволюционные процессы, их направленность и значимость для вида.

Материалы диссертации могут быть применены в лесоисследовательских лабораториях для изучения пространственной структуры насаждений дуба черешчатого для лесосеменного районирования, а также на лесохозяйственных предприятиях в европейской части Российской Федерации для создания лесосеменной базы дуба черешчатого в целях лесовосстановления и лесоразведения.

В дальнейшем возможно применение изученных биохимических маркеров для диагностики и мониторинга популяционной структуры других видов древесных растений.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Характер изменения спектра амплифицированных фрагментов ДНК дуба черешчатого различных мест происхождения коррелирует с изменением белковых зон разных климатипов.
- 2) Степень сходства биохимических показателей между климатипами у дуба черешчатого не зависит от их пространственной удаленности друг от друга и находится под контролем одинаковых лимитирующих факторов окружающей среды.
- 3) Популяция дуба черешчатого в лесостепной зоне европейской части Российской Федерации не является однородной структурой: существует 3 экотипа, различающихся по структуре инвертированных повторов и полиморфизму белкового спектра ферментов.
- 4) Построенная на основе значений коэффициентов D_N дендрограмма и составленная карта границ исследованных климатипов показывают популяционную структуру дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации и ареал распространения экотипов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на VI Международной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Алушта, 2010 г.); работа отмечена почетной грамотой, 3-ем Международном совещании «Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири» (Красноярск, 2011 г.), VII Международной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Алушта, 2011 г.), XII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2012 г.); по итогам конкурса работа отмечена почетной грамотой за 3-е место, II Международной научно-практической конференции «Инновации и технологии в лесном хозяйстве» (С.-Петербург 2012 г.); по итогам конкурса работа отмечена дипломом за 1-ое место в номинации «Семеноводство, лесная селекция, генетика и биотехнологии, лесовосстановление и лесоразведение».

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 7 публикациях, из них 3 – в научных изданиях, включенных в Перечень ВАК, 1 – в сборниках научных трудов и материалах научных конференций и 3 – в тезисах докладов, разработаны проекты «Рекомендации по сохранению генофонда дуба черешчатого и его рационального использования в лесостепи европейской части Российской Федерации» и «Методики изоферментного анализа и молекулярных маркеров для определения пространственной структуры насаждений дуба черешчатого».

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список использованных источников», «Приложение». Работа содержит 29 рисунков и 9 таблиц, список литературы включает 181 источник, в т.ч. 79 – на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

Объектами научных исследований явились древесные растения дуба черешчатого (*Quercus robur L.*). Выявление полиморфизма биохимических маркеров у дуба черешчатого и дивергенции популяций в естественном ареале осуществлялось путем анализа потомств дуба черешчатого в географических культурах, расположенных на территории России, заложенных А. М. Шутяевым в 1973 г на площади 14,8 га, где представлено 40 экотипов дуба в трех повторностях (с учетом внутривидовых категорий изучаются 85 вариантов), а также в лесных массивах естественного происхождения разных регионов. Для биохимико-генетического анализа отбирались образцы дуба черешчатого происхождением из лесостепи европейской части Российской Федерации.

Таблица 1

Образцы дуба черешчатого, отобранные для анализа

Номер по Госреестру	Местонахождение: республика, область, лесхоз	Тип условий место произрастания, тип леса	Феноформа	Класс бонитета
6	Россия, Тульская, Крапивенский	D ₂ , липовая дубрава	Ранняя	I-II
12	Россия, Воронежская, Воронцовский	D ₂ , кленово-ясеневая дубрава	Поздняя	I-II
13	«-»	D ₂₋₁ , кленовая дубрава	Ранняя + поздняя	II
15	Россия, Воронежская, Теллермановский	D ₂ , ясеневая дубрава	Ранняя + поздняя	I-II
17	Россия, Курская, Золотухинский	D ₂ , кленово-липовая дубрава	Поздняя	II
18	Россия, Белгородская, Шебекинский	D ₂ , кленово-липовая дубрава	Поздняя	II
19	Россия, Белгородская, Алексеевский	D ₂ , кленово-ясеневая дубрава	Поздняя	I
20	Россия, Брянская, Навлинский	C ₃ , липовая судубрава	Поздняя	II
21	Россия, Марий Эл, Куярский	B ₂ , травянистая суборь	Ранняя	III
22	Россия, Мордовия, Ковылкинский	D ₃ , пойменная дубрава	Ранняя	II-III
23	Россия, Татарстан, Кайбицкий	D ₂ , кленовая дубрава	Ранняя	II
24	Россия, Башкортостан, Туймазинский	D ₂ , липовая дубрава	Ранняя	III

Продолжение таблицы 1

27	Россия, Самарская, быв. Куйбышевский	D ₂ , пристепная дубрава	Ранняя	III
48	Россия, Чувашия, Порецкий	D ₂ , папоротниковая дубрава	Ранняя	II-III

Биохимический анализ образцов дуба черешчатого проводился изоферментным [Г.Г. Гончаренко и др., 1989] и ДНК-методом [Т. Maniatis et al., 1989; В.Е. Падутов и др., 2007].

Для экстракции ферментов при изоферментном анализе деревьев дуба черешчатого использовались как наиболее крупные почки, так и ткани 2–5-дневных побегов (отбор производился с января по апрель), для ДНК-анализа применяли ткани почек и листьев (отбор в течение всего года).

Изучение полиморфизма изоферментного состава в популяции дуба черешчатого

Для изучения полиморфизма изоферментного состава использовали метод электрофореза в крахмальном геле. При выборе фермента, выступающего в роли маркера популяционной структуры у растений дуба черешчатого, при изоферментном анализе в настоящей работе руководствовались рекомендациями, разработанными в «НИИ Леса» НАН Беларуси.

В ходе исследований с использованием 8 ген-ферментных систем, кодирующихся 12 локусами, был проведен изоферментный анализ ферментов метаболических путей деревьев дуба черешчатого из 14 климатипов. К таким ферментам относятся: алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1), аланинаминопептидаза (ALAP, КФ 3.4.11.2), изоцитратдегидрогеназа (IDH, КФ 1.1.1.42), фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1), глюкозофосфатизомераза (GPI, КФ 5.3.1.9), шикиматдегидрогеназа (SKDH, КФ 1.1.1.25), лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1), флюоресцентная эстераза (Fl-EST, КФ 3.1.1.2).

Пример полученных электрофореграмм белкового спектра для разных климатипов дуба черешчатого представлен на рис. 1.



22- Респ. Мордовия, 6- Тульская обл., 27- Самарская обл., 24- Респ. Башкортостан, 17-
Курская обл., 23- Респ. Татарстан, 18- Белгородская обл.
1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 1 – Электрофореграмма белкового спектра фосфоглюкомутазы

В ходе исследования изоферментного состава выявлялось разное число аллельных вариантов: от 23 (Респ. Татарстан) до 27 (Респ. Чувашия, Белгородская обл., Воронежская обл. и Респ. Марий Эл). Всего в изученных образцах дуба черешчатого обнаружено 33 аллеля. Необходимо отметить, что в насаждениях дуба черешчатого других стран, например в Беларуси, в целом было выявлено 48 аллелей [Д.И. Каган, 2012].

Установлено, что в большинстве климатипов практически в каждом локусе преобладает наиболее общий аллель 1.00. В то же время в некоторых насаждениях по ряду локусов с большой частотой встречаются другие аллели: Pgm^{0.90}, Alap-1^{0.90} и Alap-2^{1.05}. Выявлено, что наиболее изменчивыми локусами являются: Alap-1, Alap-2, Lar и Pgm, ожидаемая гетерозиготность по которым составила более 34%. В целом, в исследованных климатипах были обнаружены практически все нередкие аллели (т.е. аллели в частотой более 1%) выявленные ранее в насаждениях дуба черешчатого в Беларуси, России и Европе [Д.И. Каган, 2012; В. В. Стародубцева 1999; Т. Ohsawa et al., 2006; A. Zanetto et al., 1996].

Полученные данные электрофореграмм по полиморфизму белкового спектра исследуемых ферментов у дуба черешчатого показывают, что из 8 исследованных ферментов для проведения популяционно-генетического анализа наиболее

подходящими являются б: алкогольдегидрогеназа, аланинаминопептидаза, изоцитратдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, лейцинаминопептидаза, флюоресцентная эстераза. Было показано, что данные ферменты проявляют высокую вариабельность в своём белковом спектре в отличие от глюкозофосфатизомеразы и шикиматдегидрогеназы.

Определение характера изменения ДНК-маркеров в популяции дуба черешчатого различных мест произрастания

Выявление изменения структуры ДНК в популяции дуба черешчатого осуществляли с помощью RAPD-анализа. Изменчивость инвертированных повторов проводили с использованием 4 RAPD-праймеров Oligo 16, Oligo 29, Oligo 4, Oligo 6 (таблица 2), выделенные как наиболее информативные при популяционном анализе у дуба черешчатого [Предложения по применению изоферментного анализа и молекулярных маркеров для определения пространственной структуры насаждений дуба черешчатого. ФГУП «НИИЛГиС 2011г»].

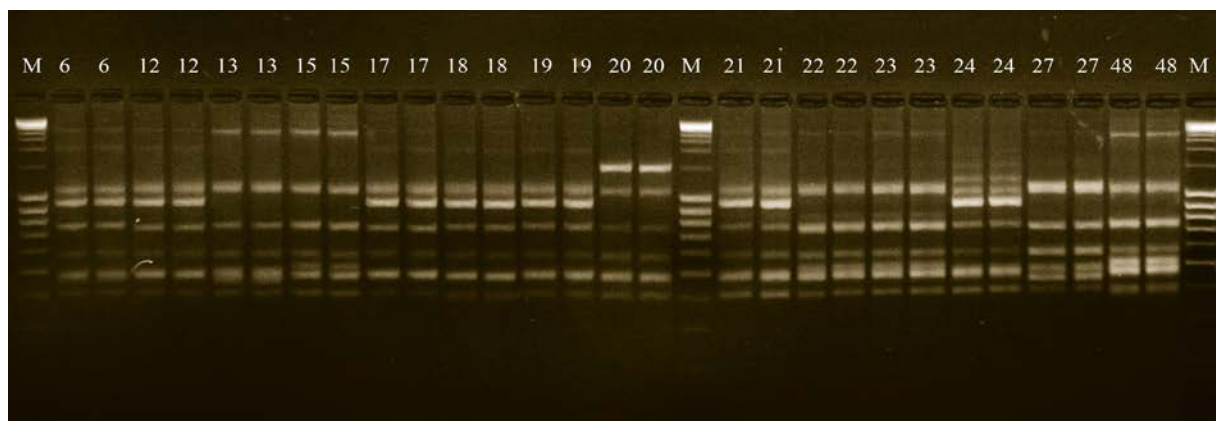
Таблица 2

Праймеры, используемые для популяционного анализа дуба черешчатого

Название	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига (Т _а)
Oligo 16	GCCCCTCGTC	48 °С
Oligo 29	CCGGCCTTAC	48 °С
Oligo 4	CAAACGGCAC	48 °С
Oligo 6	CCTGGGCCTA	48 °С

Реакцию амплификации проводили в термоциклире фирмы «Терцик» (Россия) в течение 2,5 ч. Затем выполняли электрофоретическое разделение продуктов амплификации в 2% агарозном геле.

Пример полученных электрофореграмм спектра амплифицированных фрагментов для разных климатипов дуба черешчатого представлен на рис. 2.



М – маркеры длин фрагментов 10000–80 пн,
6,12,13... – номер плантации по Госреестру

Рис. 2 – Электрофореграмма ПЦР деревьев дуба черешчатого с использованием RAPD-праймера Oligo 16

На основании полученных спектров ампликонов были составлены усреднённые таблицы, отражающие наличие или отсутствие соответствующего ампликона у групп образцов разных мест происхождения, характерного для каждого из праймеров (наличие ампликона обозначалось цифрой 1, отсутствие цифрой 0), с целью дальнейшего обсчета с помощью программного обеспечения POPGENE.

Таблица 3

Спектр ампликонов при использовании праймера Oligo 16

ампликон пн № плантации	3000	1500	1200	1000	750	600	530	500
6	0	0	1	1	1	1	0	1
12	0	0	1	1	1	1	0	1
13	1	0	1	0	1	1	0	1
15	1	0	1	0	1	1	1	1
17	0	0	1	1	1	1	0	1
18	0	0	1	1	1	1	0	1
19	0	0	1	1	1	1	0	1
20	0	1	1	0	1	1	0	1
21	0	0	1	1	1	1	0	1

Продолжение таблицы 3

22	0	0	1	0	1	1	1	1
23	0	0	1	0	1	1	1	1
24	0	0	1	1	1	1	0	1
27	0	0	1	0	1	1	1	1
48	1	0	1	0	1	1	1	1

В данной работе использовались 4 RAPD-праймеры (Oligo 4, Oligo 6, Oligo 16, Oligo 29). Полученные результаты ПЦР показали высокую вариабельность и информативность. Число амплифицированных фрагментов ДНК варьировало в зависимости от праймера от 6 (праймер Oligo 4, Oligo 6) до 8 (праймер Oligo 16, Oligo 29), а их размеры – от 300 до 3000 пн.

Полиморфизм инвертированных повторов ДНК дуба колоновидного

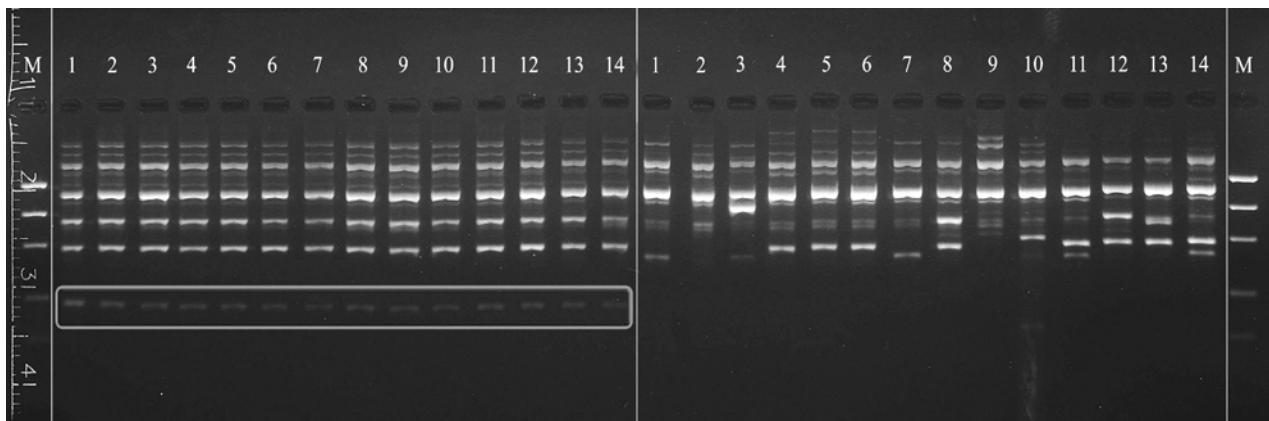
В ходе исследования по выявлению полиморфизма молекулярных маркеров (инвертированных повторов) у древесных растений на примере дуба черешчатого была проведена аналогичная работа, но в качестве объекта использовали дуб черешчатый колоновидной формы кроны (*Quercus robur Fastigiata*).

Объектами исследования полиморфизма инвертированных повторов у деревьев дуба колоновидного были: а) деревья клонового происхождения, произрастающие в городе Воронеже (прививки 1963 года) и Семилукском питомнике (прививки 1978 года); б) деревья семенного происхождения с двух делянок и краевых рядов из Семилукского питомника в возрасте 13 лет; в) образцы дуба колоновидного семенного происхождения из г. Волгограда.

Анализ изменчивости инвертированных повторов проводили с использованием 9 RAPD-праймеров (Oligo 1, Oligo 2, Oligo 3, Oligo 4, Oligo 5, Oligo 6, Oligo 12, Oligo 19, Oligo 29).

Детальный анализ спектра ампликонов по каждому из праймеров для каждой группы дубов показал высокую степень вариабельности внутри каждой выборки. Было выявлено, что один из праймеров (Oligo 5) показывал четкие отличия между образцами из г. Воронежа и г. Волгограда. В случае ПЦР образцов дуба с колоновидной формой кроны из г. Воронежа с данным праймером наблюдалась полоса на электрофореграмме в области 300 пн. Если в качестве матрицы

использовалась ДНК дуба колоновидного из Волгоградской области, данная полоса отсутствовала (рис. 3).



М – маркеры молекулярных масс (100, 300, 500, 700, 800,1000 пн);

1–14 – номер образца

Рис. 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы пирамидальной (слева) из Воронежской области и из Волгоградской (справа) в агарозном геле с использованием праймера Oligo 5

Помимо этого оказалось, что данный праймер является индикатором колоновидной формы кроны в семенном потомстве от дуба черешчатого с колоновидной формой кроны г. Воронежа. Это является весьма значимым показателем, поскольку, как известно, при семенном способе размножения у потомства пирамидального дуба идет расщепление по форме кроны. По одним литературным данным процент расщепления колеблется от 30% до 70% [Е.Е Смертин, 1988], по другим – лежит в пределах 50% [В.И. Климович, 1980]. Особого внимания заслуживает и тот факт, что фенотипически разделение по форме кроны у семенного потомства дуба колоновидного проявляются только к 4–5 годам роста и до этого момента они выглядят одинаково.

Анализ изменения биохимических показателей популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации

Материал образцов дуба черешчатого был проанализирован изоферментным методом и методом ДНК-анализа. Анализируя полученные генотипы, было

обнаружено большое количество гомозигот по альтернативным аллелям и явный недостаток гетерозигот.

Для более точной оценки уровня генетической изменчивости для каждого из исследованных климатипов дуба черешчатого были рассчитаны основные параметры генетического полиморфизма (таблица 4).

Таблица 4

Параметры генетической изменчивости исследованных климатипов дуба черешчатого

Местонахождение: республика, область, лесхоз	Доля полиморфных локусов (P)	Число аллелей на локус (A)	Средняя гетерозиготность	
			ожидаемая (H _e)	наблюдаемая (H _o)
Россия, Чувашия, Порецкий	0,833	2,167±0,718	0,316±0,039	0,269±0,032
Россия, Татарстан, Кайбицкий	0,667	1,833±0,718	0,243±0,035	0,083±0,025
Россия, Тульская, Крапивенский	0,667	2,000±0,853	0,270±0,036	0,130±0,030
Россия, Белгородская, Алексеевский	0,833	2,167±0,718	0,309±0,039	0,130±0,031
Россия, Воронежская, Воронцовский	0,667	1,917±0,793	0,280±0,037	0,093±0,027
Россия, Воронежская, Теллермановский	0,833	2,000±0,603	0,300±0,039	0,194±0,029
Россия, Белгородская, Шебекинский	0,750	2,083±0,900	0,260±0,037	0,111±0,029
Россия, Башкортостан, Туймазинский	0,667	2,083±0,900	0,307±0,037	0,148±0,032
Россия, Брянская, Навлинский	0,583	1,917±0,900	0,248±0,031	0,108±0,026
Россия, Воронежская, Воронцовский	0,833	2,167±0,718	0,318±0,040	0,139±0,032
Россия, Мордовия, Ковылкинский	0,750	2,083±0,793	0,262±0,038	0,130±0,031
Россия, Самарская, быв. Куйбышевский	0,583	1,917±0,900	0,227±0,033	0,111±0,028
Россия, Курская, Золотухинский	0,833	2,000±0,603	0,288±0,037	0,111±0,030
Россия, Марий Эл, Куярский	0,833	2,167±0,718	0,315±0,039	0,139±0,032
Среднее	0,750	2,052±0,778	0,301±0,010	0,135±0,008

Как следует из таблицы 4, доля полиморфных локусов варьирует от 0,583 до 0,833, в среднем составляя 0,750. Наибольшее значение этого показателя (0,833) выявлено в шести исследованных климатипах дуба черешчатого: Респ. Чувашия, Белгородская обл., Воронежская обл., Курская обл. и Респ. Марий Эл, наименьшее (0,583) в двух: Брянская обл. и Самарская обл.

Максимальное значение параметра, определяющего среднее число аллелей на локус (A) и равное 2,167 было установлено для двух из исследованных климатипов дуба черешчатого (Респ. Чувашия и Воронежская обл.), минимальное ($A=1,833$) – для одного (Респ. Татарстан). В целом параметр среднего числа аллелей на локус составил 2,667.

Расчет средней ожидаемой гетерозиготности (H_e) показал, что выявленные для исследованных климатипов дуба черешчатого значения H_e имеют широкий размах и находятся в пределах от 22,7% до 31,8%. Наиболее высокий уровень ожидаемой гетерозиготности (более 31%) установлен для климатипов Респ. Чувашия, Воронежская обл. и Респ. Марий Эл; самое низкое значение H_e – для Самарской области. Однако установленные значения наблюдаемой гетерозиготности (H_o) значительно ниже ожидаемой (за исключением климатипа 48, где H_o равна 26,9%) и варьируют от 9,3 до 19,4%.

Сравнение установленного на основе биохимико-генетического анализа уровня генетического разнообразия исследованных образцов дуба черешчатого с результатами популяционно-генетических исследований в других регионах показал, что в целом климатипы дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости (таблица 5) (исключение – параметр наблюдаемой гетерозиготности).

Так, выявленная доля полиморфных локусов (P_{95}) у деревьев дуба черешчатого составляет 75,0%, что соответствует средним значениям данного параметра в дубравах Центральной и Западной Европы. Количество аллелей на локус в насаждениях дуба черешчатого ($A=2,667$) Воронежской области несколько выше, чем в популяциях из Республики Марий Эл ($A=2,500$), Финляндии ($A=2,100$) и Белорусского Полесья ($A=2,500$); равен подобному показателю, установленному для насаждений из Швейцарии ($A=2,700$); и ниже, чем в дубравах Центральной и Южной Европы ($A=2,900$). Что касается средней ожидаемой гетерозиготности, то выявленные значения H_e (0,227–0,318) сравнимы с таковыми в насаждениях Германии (0,247–0,321) и значительно превышают величины H_e , установленные для насаждений из Республики Марий Эл (0,162–0,184) и Финляндии (0,188) [Д.И. Каган, 2012].

Структура популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации

На основании коэффициентов генетической дистанции Неи была установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными климатипами дуба черешчатого. Найденные значения коэффициентов генетической дистанции (D_N) представлены в таблице 6.

Таблица 6

Матрица коэффициентов генетической дистанции по Неи для географических культур дуба
черешчатого

№ п/п	№ по Госреестру	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	48	0,000													
2	23	0,047	0,000												
3	6	0,017	0,035	0,000											
4	19	0,031	0,024	0,017	0,000										
5	13	0,041	0,025	0,024	0,025	0,000									
6	15	0,040	0,029	0,021	0,031	0,012	0,000								
7	18	0,013	0,042	0,013	0,024	0,041	0,049	0,000							
8	24	0,016	0,026	0,015	0,019	0,020	0,023	0,019	0,000						
9	20	0,031	0,023	0,017	0,008	0,022	0,037	0,021	0,022	0,000					
10	12	0,022	0,053	0,051	0,055	0,046	0,052	0,038	0,019	0,056	0,000				
11	22	0,030	0,025	0,043	0,040	0,053	0,064	0,024	0,025	0,042	0,030	0,000			
12	27	0,030	0,034	0,035	0,022	0,057	0,070	0,023	0,028	0,023	0,045	0,021	0,000		
13	17	0,025	0,030	0,018	0,014	0,032	0,032	0,024	0,019	0,015	0,054	0,044	0,032	0,000	
14	21	0,008	0,025	0,012	0,018	0,023	0,025	0,014	0,011	0,021	0,024	0,020	0,024	0,020	0,000

Рассчитанные значения коэффициентов инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}) и относительно всего вида в целом (F_{IT}), а также коэффициенты подразделенности (F_{ST} и G_{ST}) приведены в таблице 7.

Таблица 7

Значения F- и G-статистик по 12 локусам дуба черешчатого из лесостепи европейской части
Российской Федерации

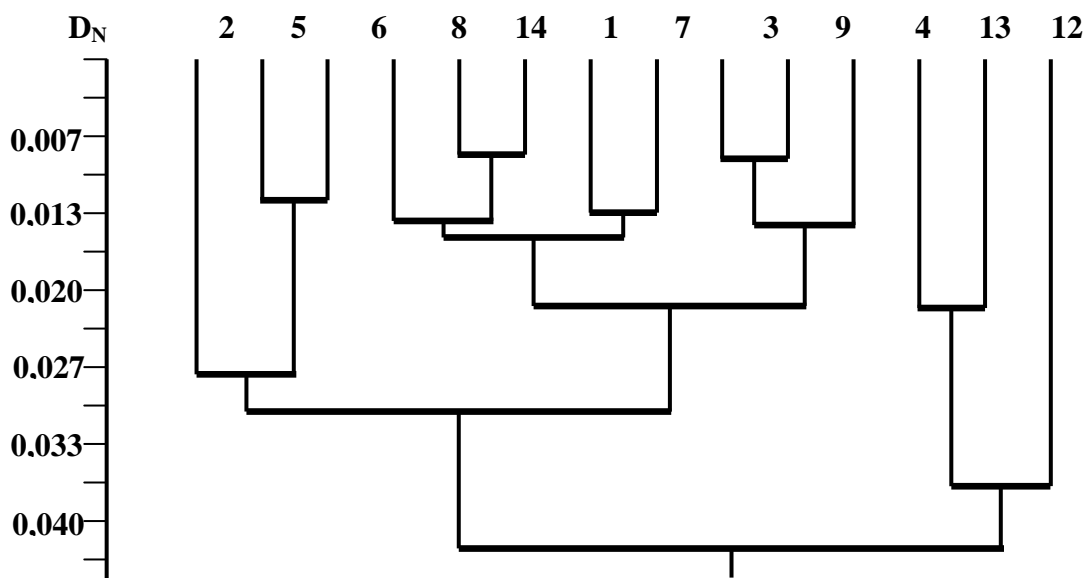
Локус	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
Fe-1	0,188	0,224	0,043	0,043
Fe-2	0,119	0,158	0,044	0,062
Pgm	0,700	0,712	0,041	0,048
Gpi-1	0,000	0,000	0,000	0,000
Gpi-2	-0,017	0,009	0,025	0,053
Idh	0,483	0,511	0,054	0,079
Alap-1	0,590	0,608	0,043	0,059
Alap-2	0,591	0,611	0,050	0,080
Lap	0,523	0,546	0,049	0,068

Продолжение таблицы 7

Adh-1	0,405	0,448	0,073	0,073
Adh-2	0,241	0,262	0,028	0,034
Skdh	-0,014	0,032	0,046	0,045
В среднем	0,318	0,344	0,041	0,054

Из таблицы 7 следует, что величины F_{IS} находится в пределах от -0,014 до 0,700, составляя в среднем 0,318. Коэффициент F_{IT} равнялся в среднем 0,344. Положительные средние значения этих двух показателей говорят о большом недостатке гетерозигот, который существует в исследованных насаждениях дуба черешчатого. Полученные значения показателей подразделенности F_{ST} и G_{ST} (0,041 и 0,054 соответственно), приведенные в таблице, позволяют говорить о том, что генетическая структура исследованных культур дуба черешчатого в целом неоднородна и на долю межпопуляционных различий приходится более 4%.

На основе рассчитанных значений коэффициентов D_N с использованием невзвешенного парно-группового анализа (UPGMA) была построена дендрограмма для исследованных климатипов дуба черешчатого (рис. 4).



1 – Чувашская Респ.; 2 – Респ. Татарстан; 3 – Тульская обл.; 4 – Белгородская обл. (номер по Госреестру – 19); 5 – Воронежская обл. (13); 6 – Воронежская обл. (15); 7 – Белгородская обл. (18); 8 – Респ. Башкортостан; 9 – Брянская обл.; 10 – Воронежская обл. (12); 11 – Респ. Мордовия; 12 – Самарская обл.; 13 – Курская обл.; 14 – Респ. Марий Эл

Рис. 4 – Дендрограмма исследованных климатипов дуба черешчатого

Исходя из структуры дендрограммы, прослеживается некоторая особенность в кластеризации исследованных климатипов дуба черешчатого. Из полученных данных видно, что всю выборку дуба черешчатого можно условно разделить на 3 больших кластера (экотипа) (рисунок 4): 1 кластер (Республика Татарстан; Воронежская область, Воронцовское лесничество; Воронежская область, Теллермановское лесничество), 2 кластер (Республика Чувашия; Тульская область; Белгородская область, Алексеевское лесничество; Белгородская область, Шебекинский лесхоз; Республика Башкортостан; Брянская область; Курская область; Республика Марий Эл), 3 кластер (Самарская область; Республика Мордовия; Воронежская область, Воронцовское лесничество).

В целом, такое объединение исследованных климатипов соответствует географическому расположению материнских насаждений, за исключением насаждений из первого кластера.

Полученные данные генетической структуры популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части РФ позволили определить границы экотипов дуба из разных мест происхождения (рис. 5).

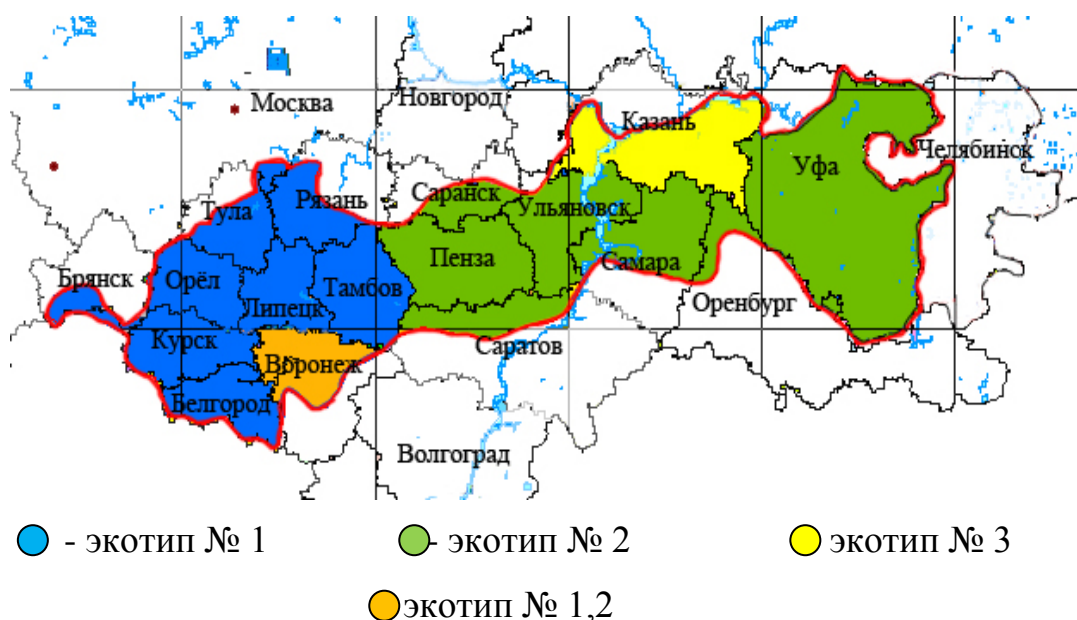


Рис. 5 – Карта границ популяционной структуры дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение изменения биохимических показателей белкового спектра ферментов и молекулярных маркеров в популяции древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в условиях различных мест обитания, показало, что популяция дуба черешчатого в лесостепной зоне европейской части Российской Федерации не является однородной структурой.

Применение биохимического анализа белкового спектра ферментов метаболических путей растительной клетки дуба черешчатого показало, что из 8 исследованных ферментов наиболее подходящими для выявления белкового полиморфизма являются 6: алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1), аланинаминопептидаза (ALAP, КФ 3.4.11.2), изоцитратдегидрогеназа (IDH, КФ 1.1.1.42), фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1), лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1), флюоресцентная эстераза (Fl-EST, КФ 3.1.1.2), поскольку данные энзимы проявляют высокую вариабельность в своём белковом спектре, в отличие от глюкозофосфатизомеразы (GPI, КФ 5.3.1.9) и шикиматдегидрогеназы (SKDH, КФ 1.1.1.25). По-видимому, этот факт связан с выполняемой функцией данных ферментов, выступающих в роли адаптационных факторов в процессе эволюции растений дуба черешчатого.

Результаты анализа белковых зон по климатипам у дуба черешчатого свидетельствуют об их отличиях. Помимо этого, были определены основные параметры генетического разнообразия. Так, доля полиморфных локусов (P) в исследуемых климатипах варьирует от 58,3% до 83,3%, число аллелей на локус (A) – от 1,833 до 2,167.

Молекулярно-биологический метод анализа на основе полимеразной цепной реакции с RAPD-праймами позволил исследовать полиморфизм инвертированных повторов в геноме растений дуба черешчатого, произрастающих в условиях различных мест обитания.

Установлены различия в спектре амплифицированных фрагментов ДНК и выявлены зоны, характеризующие разные климатипы.

Изменение спектрального профиля амплифицированных фрагментов ДНК дуба черешчатого различных мест происхождения показало корреляцию с характером изменения белковых зон по климатипам.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что всю популяцию дуба черешчатого можно условно разделить на три больших кластера, имеющих сходный биохимико-генетический профиль.

Следует отметить, что степень сходства климатипов дуба черешчатого по своим биохимическим показателям не зависит от пространственной удаленности климатипов друг от друга. Данный факт свидетельствует о схожести эволюционных процессов, происходящих в разных климатипах. Подобное явление могло иметь место в случае, когда на протекание эволюционных процессов оказывает действие одинаковый фактор. Предположительно, одним из таких факторов может являться показатель увлажненности, поскольку водный баланс в растительной клетке играет значительную роль, регулируя протекание большинства биохимических реакций метаболических процессов. Подобная информация может оказаться весьма ценной при лесовосстановлении и лесоразведении, в случае необходимости переброски посадочного материала дуба черешчатого из одного района в другой.

Кроме того, результаты биохимического анализа популяции дуба черешчатого позволяют с высокой степенью достоверности проследить возможные пути миграции субпопуляционных структур дуба черешчатого.

Разработанные позиции настоящей работы могут быть использованы для объяснения эффекта полиморфизма на генетическом уровне и по отношению к другим древесным растениям, таким как ель, сосна, тополь, береза и др. Такое возможно, поскольку эти растения по образу и условиям произрастания, по морфологическим признакам, по особенностям биохимического обмена сходны с дубом черешчатым, и поэтому можно аппроксимировать результаты, полученные на растениях дуба черешчатого, на растения, которые с точки зрения биохимико-генетической структуры весьма близки к исследуемой породе древесного растения.

ВЫВОДЫ

1. Биохимико-генетический анализ 14 климатипов дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации с использованием 8 ген-ферментных систем, кодирующихся 12 локусами, выявил, что из 8 исследованных ферментов для проведения популяционно-генетического анализа наиболее подходящими являются 6: алкогольдегидрогеназа, аланинаминопептидаза, изоцитратдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, лейцинаминопептидаза, флюоресцентная эстераза. Такой выбор объясняется функцией данных ферментов, выступающих в роли адаптационных факторов в процессе эволюции растений.

2. Полученные результаты ПЦР инвертированных повторов ДНК по 4 RAPD-праймерам показали высокую вариабельность и информативность. В среднем при RAPD-анализе у дуба черешчатого один праймер инициировал синтез 7 фрагментов ДНК.

3. Анализ спектра ДНК-маркеров у дуба черешчатого колоновидной формы кроны выявил, что образцы из г. Воронежа и г. Волгограда относятся к разным экотипам. Более того, было обнаружено, что праймер Oligo 5 может являться индикатором колоновидной формы кроны в семенном потомстве от дуба черешчатого с колоновидной формой кроны в экотипе г. Воронежа.

4. Оценка основных параметров генетического разнообразия показала, что исследованные климатипы дуба черешчатого характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости (исключение – параметр наблюдаемой гетерозиготности). Доля полиморфных локусов (P) варьирует от 58,3% до 83,3%, число аллелей на локус (A) – от 1,833 до 2,167. Расчет средней ожидаемой гетерозиготности (H_e) показал, что выявленные для исследованных климатипов дуба черешчатого значения H_e имеют широкий размах и находятся в пределах от 22,7% до 31,8%.

5. Анализ популяционной структуры исследованных климатипов *Q. robur* с помощью F-статистик Райта выявил значительный (около 31,8%) недостаток гетерозигот в усредненной популяции дуба и более сильный (около 34,4%) дефицит гетерозигот у исследованных насаждений в целом.

6. На основании коэффициентов генетической дистанции Неи была установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными

климатипами дуба черешчатого. Значения данного показателя варьируют от 0,008 до 0,071, в среднем составляя 0,029.

7. Величины показателя коэффициента инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}) находятся в пределах от -0,017 до 0,700, составляя в среднем 0,318. Коэффициент инбридинга особи относительно всего вида в целом (F_{IT}) равнялся в среднем 0,344. Положительные средние значения этих двух показателей говорят о большом недостатке гетерозигот, который существует в исследованных насаждениях дуба черешчатого. Полученные значения показателей подразделенности F_{ST} и G_{ST} (0,041 и 0,054 соответственно) позволяют говорить о том, что генетическая структура исследованных культур дуба черешчатого в целом неоднородна и на долю межпопуляционных различий приходится более 4%.

8. Рассчитанная на основе значений коэффициентов D_N дендрограмма показала наличие трех экотипов в исследованной выборке дуба черешчатого. Определены границы популяционной структуры в лесостепи европейской части Российской Федерации, и на основе полученных данных составлена карта границ популяционной структуры дуба черешчатого.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Публикации в научных изданиях, включенных в Перечень ВАК

1. Карпеченко К. А. Эколого-биохимическое изучение дуба колоновидного *Quercus robur Fastigiata* (*Q. robur var pyramidalis*) / К. А. Карпеченко, О. А. Землянухина, И. Ю. Карпеченко, В. Н. Вепринцев, А. М. Кондратьева, **Н. А. Карпеченко**, В. Н. Калаев // Проблемы региональной экологии. – 2013. – № 2. – С. 76–80.
2. Карпеченко К. А. Изучение метаболизма плюсовых деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur L.*) / К. А. Карпеченко, И. Ю. Карпеченко, О. А. Землянухина, В. Н. Вепринцев, А. М. Кондратьева, **Н. А. Карпеченко**, В. Н. Калаев // Фундаментальный исследования. – 2013. – № 1. – С. 287–291.
3. Калаев В. Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В. Н. Калаев, О. А. Землянухина, И. Ю. Карпеченко, К. А. Карпеченко, А. М. Кондратьева, В. Н. Вепринцев, **Н. А.**

Карпеченко, С. С. Карпова // **Фундаментальные исследования.** – 2012. – № 5. часть 1. – С. 148–152.

Статьи в сборниках научных трудов и материалов научных конференций

4. Карпеченко И. Ю. Изучение биохимических особенностей метаболизма плюсовых деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur*) / И. Ю. Карпеченко, В. Н. Вепринцев, О. А. Землянухина, А. М. Кондратьева, К. А. Карпеченко, **Н. А. Карпеченко** // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов, ВГУ. – 2012. – С. 81–89.

Тезисы докладов

5. **Карпеченко Н. А.** Применение методов ПЦР в ранней диагностике формоспецифичности дуба черешчатого (*Quercus robur L.*) / **Н. А. Карпеченко**, О. А. Землянухина, И. Ю. Карпеченко, В. Н. Вепринцев, А. М. Кондратьева // II Международная научно-практическая конференция «Инновации и технологии в лесном хозяйстве», С-Петербург. – 2012.

6. **Карпеченко Н. А.** Разработка метода ранней диагностики формоспецифичности дуба черешчатого (*Quercus robur*) / **Н. А. Карпеченко**, О. А. Землянухина, И. Ю. Карпеченко, В. Н. Вепринцев, А. М. Кондратьева // XII Молодёжная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», Москва. – 2012.

7. Карпеченко К. А. Использование молекулярно-генетического метода на основе ПЦР для Формоспецифичного анализа дуба (*Quercus robur*) / К. А. Карпеченко, В. А. Семенова, О. А. Землянухина, **Н. А. Карпеченко** // 3-е международное совещание «Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири», Красноярск. – 2011.