

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Карпеченко Никита Александрович

АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ СПЕКТРОВ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ
ПУТЕЙ И ИНВЕРТИРОВАННЫХ ПОВТОРОВ ДНК ДРЕВЕСНЫХ
РАСТЕНИЙ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В
ЛЕСОСТЕПИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Специальность 03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Попов В. Н.

Воронеж – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Характеристика дуба черешчатого (<i>Quercus robur L.</i>).....	13
1.2. Биологическое разнообразие дуба черешчатого.....	14
1.3. Метаболические пути растительной клетки.....	17
1.4. Биохимические методы в исследовании древесных пород растений.....	27
1.5. Биохимико-генетические исследования рода <i>Quercus</i>	30
1.5.1. Изоферментный анализ древесных растений.....	30
1.5.2. Анализ структуры ДНК древесных растений.....	33
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	39
2.1. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.2.1. Объекты исследования.....	39
2.2.2. Методы исследования.....	42
2.2.2.1. Определение изоферментного состава	42
2.2.2.2. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК.....	43
2.2.2.2.1. Получение нуклеиновых кислот.....	43
2.2.2.2.2. Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК.....	44
2.2.2.2.3. Полимеразно-цепная реакция.....	44
2.2.2.2.4. Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР.....	45
2.2.2.3. Математическая обработка полученных результатов.....	45
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	51
3.1. Изучение полиморфизма изоферментного состава в популяции дуба черешчатого.....	51
3.1.1 Алкогольдегидрогеназа.....	53

3.1.2 Аланинаминопептидаза.....	55
3.1.3 Изоцитратдегидрогеназа.....	57
3.1.4 Фосфоглюкомутаза.....	59
3.1.5 Глюкозофосфатизомераза.....	61
3.1.6 Шикиматдегидрогеназа.....	63
3.1.7 Лейцинаминопептидаза.....	65
3.1.8 Флюоресцентная эстераза.....	67
3.2. Определение характера изменения ДНК-маркеров в популяции дуба черешчатого различных мест произрастания.....	69
3.3. Полиморфизм ДНК-маркеров дуба колоновидного.....	76
3.4. Анализ изменения биохимических показателей популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации.....	81
3.5. Структура популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	98
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	116
Приложение 1. Рецепттура окрашивающих растворов и методика окрашивания гелевых срезов.....	117
Приложение 2. Генотипы деревьев дуба черешчатого из лесостепи европейской части Российской Федерации по 12 изоферментным локусам.....	123
Приложение 3. Электрофореграммы продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной разных мест происхождения с использованием 9 RAPD- праймеров.....	129

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ПЦР, PCR – полимеразная цепная реакция, polymerase chain reaction
- ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- QTLs – quantitative trait locus
- ГМИ – генетически модифицированные источники
- STSs – sequence tagged sites
- EST – expressed sequence tag
- SINE, LINE – short and interspersed repetitive elements
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- VNTR – variable number of tandem repeats
- SSR – simple sequence repeat
- STR – short tandem repeat
- VNTRs – переменное число тандемных повторов
- HVRs – гипервариабельное число тандемных повторов
- RAPD – random amplified polymorphic DNA
- SCAR – sequence characterized amplified region
- AFLP – amplified fragment length polymorphism
- ISSR – inter-simple sequence repeats
- IRAP – inter-retransposon amplified polymorphism
- SNPs – single-nucleotide polymorphism
- ЛСП – лесосеменные плантации
- ММФФ – множественные молекулярные формы фермента
- АТФ – adenosinetriphosphate
- ПБК – пировиноградная кислота
- ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса
- FADH₂ – flavinadeninedinucleotide
- ЭТЦ – электронтранспортная цепь
- УСР – ultra corep rotector

ЦТАБ – цетилтриэтиламмоний бромид
ПВП – поливинилпирролидон
ПААГ – полиакриламидный гель
Пн – пары нуклеотидов
ДМФА – диметилформамид;
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазолил 1-2) 2,5-дифенил-тетразолий;
НАД – никотинамидадениндинуклеотид;
НАДН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида;
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
НСТ – нитросиний тетразолий;
Т-НСТ – тетранитросиний тетразолий;
Трис – трис - (гидроксиметил) - аминометан;
Трис-НСl – трис - (гидроксиметил) - аминометан гидрохлорид;
ФМС – феназинметасульфат;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

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 [98].

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 [39].

Изменение аминокислотной последовательности молекулы фермента и, как следствие, образование различных её форм, по мнению ряда авторов, носит адаптационный характер [18, 38]. 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 [18]. 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 [178].

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 хозяйств применяют в основном ДНК-маркеры. К данной группе маркеров относятся элементы генома, в основном микросателлиты, так называемые STR-маркеры, или последовательности ДНК, ограниченные инвертированными повторами [40].

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 представляет собой дерево первой величины, достигающее 35–40 м высоты и диаметр ствола до 2,5 м при благоприятных условиях произрастания. 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 [43]. 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 актуальным направлением 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, произрастающего 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.

Личный вклад соискателя. Основные результаты исследований, представленные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии в лабораториях кафедры биохимии и физиологии клетки ВГУ. Определение оптимальных условий получения чистых препаратов ДНК и амплификации инвертированных повторов, интерпретация и анализ данных, написание текста диссертации выполнены соискателем самостоятельно.

Автор благодарит научного руководителя, д.б.н. профессора В.Н. Попова, к.б.н. О.А. Землянину, сотрудников лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси к.б.н. С.И. Ивановскую, к.б.н. Д.И. Кагана, к.б.н. О.Ю. Баранова за советы и консультации при проведении исследований и подготовке диссертации, а также декана биолого-почвенного

факультета ВГУ, д.б.н. профессора В.Г. Артюхова и преподавателей кафедры биохимии и физиологии клетки ВГУ за всестороннюю помощь.

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, 2012г.); по итогам конкурса работа отмечена почетной грамотой за 3-е место, II Международной научно-практической конференции «Инновации и технологии в лесном хозяйстве» (С.-Петербург 2012г.); 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 материалов научных конференций и 3 – в тезисах докладов, сделанных на съездах и конференциях России и за рубежом (2010–2013 гг.), 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», «Ре-

зультаты 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика дуба черешчатого (*Quercus robur L.*)

Дуб черешчатый (*Quercus robur L.* или *Q. Pedunculata Fhrh.*) относится к семейству *Fagaceae* A. Br., подсемейству *Quercoideae* Oerst., роду *Quercus L.*

Дуб черешчатый является деревом первой величины, вырастающим до 35–40 м высоты с диаметром ствола до 2,5 м [23, 25, 67, 91]. Корневая система дуба черешчатого мощная, глубокая. Стержневой корень, в среднем достигает глубины 5 м, но иногда и до 22 м в глубину [43, 66].

Современный ареал дуба черешчатого в России находится в пределах подзоны широколиственных лесов и лесостепи европейской части страны. Во флоре Западной Сибири он в естественных насаждениях отсутствует, хотя в доледниковый период дубравы были неотъемлемой частью лесостепной зоны Западной Сибири.

Обширное распространение дуба черешчатого в районе континентального климата характеризует его зимо- и морозоустойчивость [32, 44].

Дуб черешчатый относится к солевыносливой породе древесных растений, удовлетворительно растущей на засоленных почвах [66]. Однако некоторыми авторами высказывается противоположное мнение [9, 55].

По отношению дуба черешчатого к засухе в литературе присутствуют противоречивые данные. П.С. Погребняк считал, что дуб черешчатый является ксеромезофитом [68]. По другим данным дуб черешчатый – типичная засухоустойчивая порода растений [66, 97].

Засухоустойчивость дуба черешчатого в первую очередь определяется наличием мощной корневой системы, благодаря чему он может произрастать на сухих почвах. Вторая особенность дуба черешчатого, характеризующая его устойчивость к засухе – способность значительно сокращать транспирацию в сухое время [43, 67].

Плоды у дуба черешчатого – желуди. В нижней части они окружены сильно разросшейся плюской. Зрелые желуди длиной 20–40 мм, шириной 10–25 мм с шипиком на вершине, по 1–3 на плодоносе (черешке), длиной от 2 до 8 см, опадают на землю, отделяясь от плюски через 100–114 дней после цветения. Масса 1000 штук желудей – от 2000 до 11000 г [27, 102]. Свежесобранные желуди имеют влажность до 80% от абсолютно сухой массы. С уменьшением влажности снижается всхожесть желудей, а при влажности ниже 45% от веса сухого вещества утрачивается способность к набуханию и прорастанию [14, 28]. Наиболее высокими посевными качествами обладают желуди влажностью 60–65% [28, 51]. Лучшие желуди сохраняют свои посевные качества при температуре 0°С [86]. Температуру до –5°С непроросшие желуди выдерживают 120 дней. В дубравах повреждаемость желудей вредителями и болезнями в среднем составляет 34% [86].

Плодоношение дуба черешчатого начинается с 18–50 лет, достигает максимума в 60 лет и продолжается до 300 лет [100].

1.2. Биологическое разнообразие дуба черешчатого

Выделяются три основных уровня разнообразия: видовое, генетическое и разнообразие экосистем.

Генетическое разнообразие представляет собой сумму генетической информации, находящейся в генах всех живых существ. К разнообразию экосистем относится количество разных местообитаний, экологических ниш на различных ландшафтах. Как правило, различают биоразнообразие двух классов [47]: альфа-разнообразие – разнообразие по присутствию видов внутри местообитания, и бета-разнообразие – по присутствию видов в популяциях, локализованных в разных средах обитания.

Показатель величины биоразнообразия является в биологии одним из основных признаков жизнеспособности (живучести) вида и экосистемы в целом. Этот показатель был назван «Принцип биологического разнообразия».

Как показывают исследования, у особей внутри одного вида, имеющих высокое однообразие характеристик (это относится и к человеку, и к растениям, и к микроорганизмам) всякое существенное изменение окружающей среды более пагубно скажется на общей выживаемости вида, чем в случае, когда имеется большая степень биологического разнообразия [48, 87, 96].

М.В. Придня 1995 [70] отмечает, что наиболее ценно разнообразие внутри вида, то есть спектр всех подвидов, разновидностей и форм их существования (популяций), отличающихся генофондом. По мнению автора, этот уровень разнообразия должен быть составной частью альфа-бета-разнообразия, а при некоторых обстоятельствах эта категория приобретает исключительно самостоятельное значение. Л.И. Милютин (1995) [56] подчеркивает, что биоразнообразие лесных видов и разнообразие условий выращивания следует рассматривать комплексно: биоразнообразие – это оценка экологических условий произрастания леса в отдельных регионах [26]. По мнению А.Н. Громцева (1995) [24], ландшафтная основа представляется наиболее удобной для выявления и оценки биоразнообразия на видовом и экосистемном уровнях; причинами возникновения биоразнообразия среди лесных видов являются ландшафтообразующие факторы (увлажнение, рельеф, почва, материнские породы, температура и другие). Л.П. Рысин (1995) [75] считает, что каждому типу ландшафта будет соответствовать некоторое множество типов леса [26, 75].

Современные селекционные работы в основном акцентированы на повышении продуктивности и адаптивности древесных растений, улучшении их качества. В генетике и селекции деревьев изучение биоразнообразия необходимо для популяционного семеноводства.

В этом плане выделяются следующие уровни биоразнообразия [102]:

1. Систематико-таксономическое разнообразие – межвидовое и внутривидовое;
2. Жизненно-стратегическое разнообразие – географическое и эдафическое.

Систематико-таксономическое биоразнообразие предопределяет селекцию и лесовыращивание древесных видов в разрезе тех таксонов, которые приняты в систематике «Международным Кодексом» ботанической номенклатуры (1980) (вид – подвид – разновидность – форма – биотип).

Межвидовое разнообразие предопределяет селекцию видов одного рода. Виды характеризуются биологическими и экологическими свойствами, занимают разные экологические ниши на разных высотах горного пояса. В определенных экологических условиях дубравы состоят из 2–4 видов дуба. До последнего времени в материалах учета лесного фонда страны неизвестна площадь, занимаемая каждым видом дуба, и площадь дубрав, сложных по видовому составу [96].

Также у дуба черешчатого выделяют биоразнообразие на внутривидовом уровне. Внутривидовое биоразнообразие предопределяет селекцию внутривидовых таксонов – подвидов, разновидностей, форм, биотипов. Наиболее изученным в этом плане является дуб черешчатый.

Знание структуры популяции любой части ареала вида в значительной степени уточняет и разрешает важные проблемы внутривидовой систематики и биогеографии, является необходимой основой развития эволюционного учения [85]. Вопросы биоразнообразия связываются в настоящее время с генетическим уровнем популяционной организации вида, характеризующимся определенными биохимическими показателями [35]. Исследования этого вопроса имеют и прикладное значение. Установление популяционной структуры вида, отражающей путь его дифференциации в соответствии с биологией самого вида и естественно-историческими факторами, является узловым моментом при определении его генетического потенциала.

Установлено, что простейшими единицами существования видов являются популяции. Генетическая структура любой популяции определяется совокупностью генотипов образующих её индивидов [1].

Генетическая структура популяций вида формируется в течение длительного биологического времени (многих поколений) под влиянием такого

фактора эволюции как естественный отбор, который направлен на сохранение генотипов, наиболее приспособленных к определенным условиям обитания. Учет такой структурной организации при планировании и проведении лесовосстановительных мероприятий позволяет не только создавать высокопродуктивные и устойчивые в соответствующих условиях произрастания насаждения, но и обеспечивает сохранение генофондов многих древесных растений [1].

1.3. Метаболические пути растительной клетки

Комплекс химических реакций, протекающих в клетках и обеспечивающих организм энергией и веществами для поддержания его роста, жизнедеятельности и размножения называют метаболизмом. Внутри клетки питательное вещество претерпевает ряд химических изменений, катализируемых ферментами. Различают два типа метаболизма: 1) анаболизм и 2) катаболизм. Анаболические реакции обеспечивают образование элементов структуры клеток и тканей и заключаются в синтезе сложных молекул из более простых. Катаболические превращения представляют собой реакции расщепления сложных молекул до простых компонентов как поступивших с пищей, так и входящих в состав клетки. Оба вида метаболизма имеют корреляцию во времени и пространстве. Выяснение отдельных звеньев метаболизма у разных классов растений, животных и микроорганизмов выявило высокую степень сходства путей биохимических превращений [15]. Взаимосвязь обмена между углеводами, жирами и белками имеет большое значение в жизни растений. Например, превращение крахмала в сахара и жиры в зимние месяцы у деревьев повышает их устойчивость к морозам.

В ходе метаболизма протекают важнейшие для живого организма процессы. Некоторые этапы данного процесса имеют общность путей биохимических превращений у разных групп организмов. Метаболизм клетки выполняет четыре специфические функции: 1) обеспечение химической энергией;

2) превращение молекул пищевых веществ в строительные элементы, которые используются в дальнейшем клеткой для построения макромолекул; 3) сборку белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов и прочих клеточных компонентов из этих строительных блоков; 4) синтез и разрушение тех биомолекул, которые необходимы для выполнения каких-либо специфических функций данной клетки [61].

Одним из основных процессов обмена веществ растительного организма является дыхание, благодаря которому осуществляется питание органическими веществами на уровне клеток. Установлено, что у растений дыхание происходит преимущественно ночью. Днём растения в основном освобождают кислород из связанного состояния в процессе фотосинтеза [20, 21].

Клеточное дыхание представляет собой окислительный распад органических питательных веществ клетки, происходящий с образованием метаболитов, имеющих химическую активность, и освобождением энергии. Данные метаболиты в дальнейшем используются клетками для процессов жизнедеятельности [49]. Клеточное дыхание входит в систему процессов катаболизма. Данный процесс включает этапы транспорта белков через клеточные мембраны, собственно окисление, реализуемое в митохондриях и приводящее к преобразованию энергии химических связей веществ, поступающих в организм с пищей. В качестве исходных субстратов для дыхания могут выступать различные вещества. Например, такие как углеводы, белки и жиры, преобразуемые в ходе определенных метаболических процессов в ацетил-КоА с высвобождением группы побочных продуктов. Восстановление НАД (НАДФ) и образование АТФ может происходить уже на этом этапе, но, как правило, большая их часть образуется в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) при переработке ацетил-КоА [72]. Энергия, которая высвобождается в результате данных процессов, запасается в химических связях макроэргических соединений АТФ, НАДН. Затем она расходуется на процессы роста всего растения и на поддержание в активном состоянии уже выросших органов. На промежуточных стадиях процесса дыхания образуются различные орга-

нические соединения, которые затем могут использоваться в различных реакциях метаболизма. К таким промежуточным соединениям относят пентозы и органические кислоты, синтезируемые в разных путях дыхательного окисления. Таким образом, дыхание является источником многих метаболитов, обеспечивая протекание большинства жизненно важных процессов организма [13, 49, 72].

Основные метаболические пути, используемые для синтеза и распада клеточных веществ – цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), пентозофосфатный и глиоксилатный циклы, гликолиз и некоторые другие [31].

Самым ранним с эволюционной точки зрения из известных способов генерации энергии считается гликолиз (фосфотриозный путь).

Гликолитический путь состоит из 10 последовательных реакций (рис. 1). Каждая такая реакция катализируется своим отдельным ферментом. Гликолиз локализован в цитозоле. Это универсальная последовательность биохимических реакций, в ходе которых богатое энергией вещество глюкоза последовательно окисляется до конечного продукта пирувата [59, 78]. Процесс дыхания начинают рассматривать с глюкозы. Но в растительных клетках этого вещества мало, поскольку конечными продуктами процесса фотосинтеза являются сахароза, как основная транспортная форма сахара в растении, или запасные углеводы (крахмал и др.) [60]. Поэтому, чтобы стать субстратом дыхания, сахароза и крахмал должны гидролизироваться с образованием глюкозы. Важным ферментом данного процесса является фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1) [18, 79, 164]. Фермент класса трансфераз катализирует внутримолекулярный перенос фосфата при образовании глюкозо-6-фосфата из глюкозо-1-фосфата в процессе гликолиза в реакции, следующей за фосфолизом гликогена. Фосфат при этом переносится из положения 1 в одной молекуле глюкозы в положение 6 другой молекулы; при этом глюкозо-1,6-дифосфат является коферментом реакции, требующей присутствия ионов Mg^{2+} . При этом дефосфорилированная фосфоглюкомутаза принимает на себя одну фосфатную группу, стоящую при первом углеродном атоме глюкозо-

1,6-дифосфата. Так образуется глюкозо-6-фосфат, а фермент переходит вновь в фосфорилированную форму. Данный фермент локализован в цитоплазме [176]. Молекулярная масса белковой молекулы 60 000 – 112 000 кДа. В клетках одного организма фосфоглюкомутаза может присутствовать в виде различных изоферментов. Фосфоглюкомутаза широко распространена в растительных, животных и микробных клетках [6].

В общем виде процесс гликолиза условно можно разделить на два этапа. На первом этапе происходит расходование энергии 2 молекул АТФ. Данный процесс заключается в распаде молекулы глюкозы на 2 молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Затем осуществляется НАД-зависимое окисление глицеральдегид-3-фосфата. На этом этапе происходит синтез 2 молекул АТФ. Гликолиз является полностью анаэробным процессом [80].

В результате гликолиза происходит превращение одной молекулы глюкозы в две молекулы пировиноградной кислоты (ПВК) и генерация двух восстановительных молекул кофермента НАДН.

Процесс гликолиза имеет вид:



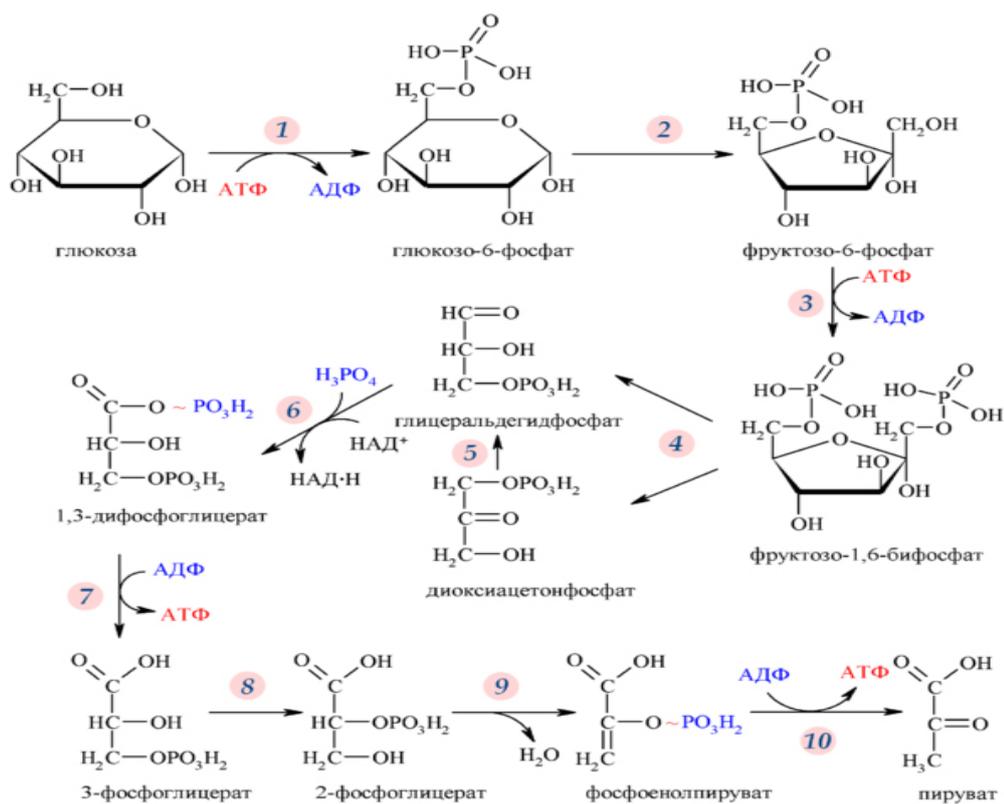


Рис. 1. Схема гликолиза

Важным ферментом для регуляции углеводного обмена является глюкозофосфатизомераза (GPI, КФ 5.3.1.9), который, наряду с другими факторами, регулирует количество глюкозо-6-фосфата, поступающего в гликолиз [18].

Конечные продукты реакции гликолиза в аэробных условиях подвергаются дальнейшим преобразованиям в биохимических циклах, входящих в систему клеточного дыхания [118].

В случае, когда доступ кислорода ограничен, протекает процесс спиртового брожения. В ходе спиртового брожения пировиноградная кислота в дальнейшем подвергается декарбоксилированию, и образовавшийся уксусный альдегид восстанавливается водородом при участии фермента алкогольдегидрогеназы (АДН, КФ 1.1.1.1). Он катализирует процесс восстановления ацетальдегида до этилового спирта [64]. При образовании активной молекулы алкогольдегидрогеназы необходимо объединение двух белковых субъе-

диниц, вследствие того, что фермент приобретает димерную структуру.

Алкогольдегидрогеназа – адаптивный фермент класса дегидрогеназ, катализирующий окисление спиртов и ацеталей до органических соединений карбонильной группы – альдегидов и кетонов. Установлено, что специфичность фермента к субстрату зависит от его белковой части. Так, большинство НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ нуждаются в присутствии ионов металлов (Me^{2+}). Для алкогольдегидрогеназы таким кофактором являются ионы цинка [176].

Второй этап клеточного дыхания представляет цикл Кребса – цикл трикарбоновых кислот (рис. 2). Цикл Кребса является ключевым этапом дыхания всех клеток, использующих в качестве акцептора электронов кислород. Помимо этого в нем находится центр пересечения большого количества метаболических путей организма [128].

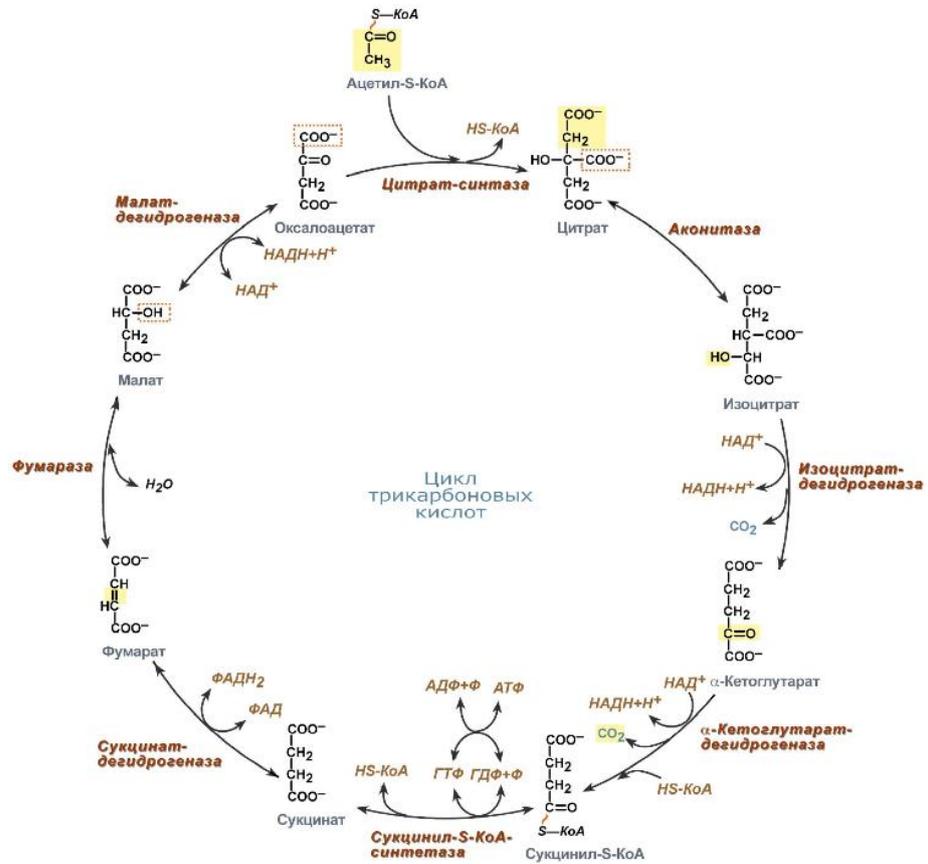
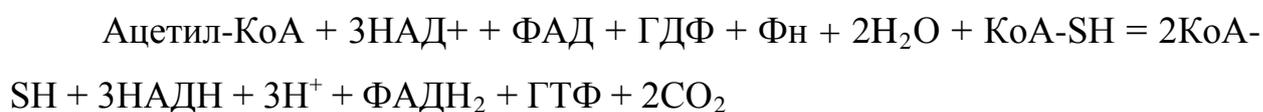


Рис. 2. Цикл трикарбоновых кислот

Цикл трикарбоновых кислот был открыт Хансом Кребсом. За эту работу он был удостоен Нобелевской премии по химии в 1953 году, совместно с Ф. Липманом.

В ЦТК происходит превращение двух- и трёхуглеродных соединений до углекислого газа. Освобождённый при этом водород транспортируется в цепь тканевого дыхания, где в дальнейшем происходит его окисление до воды, принимая непосредственное участие в синтезе основного источника энергии – АТФ. В ЦТК на различных регуляторных пунктах функционирует множество ферментов [119].

Суммарное уравнение реакций:



У эукариот все реакции цикла Кребса протекают внутри митохондрий. Ферменты ЦТК, кроме одного, находятся в свободном состоянии в матриксе митохондрий, исключение составляет сукцинатдегидрогеназа, которая локализована на внутренней митохондриальной мембране. У прокариот реакции цикла трикарбоновых кислот протекают в цитоплазме [176].

На одной из ключевых стадий цикла Кребса функционирует фермент изоцитратдегидрогеназа (ИДН, КФ 1.1.1.42), катализируя обратимую реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата [52]. Превращение изоцитрата в 2-оксоглутарат является реакцией, лимитирующей скорость протекания всего процесса в целом. А тип фермента, НАДФ-зависимый, встречается как в митохондриях, так и в цитозоле, что связано с регуляцией цикла, сама изоцитратдегидрогеназа ингибируется НАДН и активируется цитратом. Активность фермента зависит от присутствия ионов кальция. Изоцитратдегидрогеназа – один из наиболее распространенных популяционно-генетических маркеров, представляющий собой чаще всего сложный гетерополимер [76].

Установлено, что у растений и некоторых микроорганизмов существует модификация ЦТК – глиоксилатный цикл, благодаря которому осуществляется поставка органических кислот. Он представляет собой модификацию

цикла Кребса и локализован в особых органеллах глиоксисомах – разновидностях микротелец. Глиоксилатный цикл функционирует на ранних этапах онтогенеза растений, в различные физиологические периоды жизни многих организмов и широко распространен в природе. Физиологическая роль глиоксилатного цикла для растений – важный этап глюконеогенеза, обеспечивающий растущий организм в условиях гетеротрофного питания доступными формами органического вещества [19].

Изучение энергетики дыхания привело к открытию процесса окислительного фосфорилирования, а исследование связи между брожением и дыханием позволило обнаружить принципиально новый путь аэробного окисления углеводов – пентозофосфатный цикл. Пентозофосфатный путь значительно отличается от гликолиза. Этот путь дыхания известен также как пентозный шунт, гексозомонофосфатный цикл или апотомическое окисление [76]. В процессе окисления участвует не НАД, как в гликолизе, а НАДФ. В реакциях гликолиза не образуется углекислый газ, который является одним из продуктов пентозофосфатного пути. Пентозофосфатный путь не генерирует АТФ и для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот поставляет рибозу.

Пентозофосфатный путь дыхания является также основным источником образования эритрозо-4-фосфата [76]. При взаимодействии эритрозо-фосфата с фосфоенолпируватом синтезируется шикимовая кислота. Шикимовая кислота является материалом для синтеза ряда важных метаболитов, таких как фенольные соединения, лигнин, группы ароматических аминокислот [8].

Шикиматный путь имеет большое значение среди метаболических процессов. В ходе этого пути синтезируются фенилаланин, тирозин, триптофан, салицилат, бензоат, ароматические предшественники терпеноидных хинонов (убихинонов, пластохинонов, филлохинонов, менахинонов), токоферолов, фолата, меланинов, лигнинов, таннинов и другие соединения, играющие в природе различную роль [53]. Этот путь на сегодняшний день единст-

венный установленный путь биосинтеза некоторых важнейших природных соединений, также значимых в целях практического их использования [8, 53].

Ключевым ферментом шикиматного пути является шикиматдегидрогеназа (SKDH, КФ 1.1.1.25), которая представляет собой фермент, окисляющий шикимовую кислоту. Она является предшественником ароматических аминокислот, алкалоидов и других ароматических метаболитов и играет важную роль в адаптации метаболизма растений к стрессовым условиям.

Другая, не менее важная группа ферментов, участвующая в адаптивных процессах в растениях, это эстеразы. Термином «эстераза» (EST, КФ 3.1.1.1.1) обозначают ферменты, относящиеся к классу гидролаз и способные гидролизовать простые эфиры N-свободных спиртов и органических кислот (сложноэфирные связи) на спирты и кислоты при участии молекул воды в процессе гидролиза [84]. К эстеразам относятся липазы, сульфатазы, фосфатазы, собственно эстеразы. К последним принадлежат многочисленные специфические ферменты: холинэстераза, танназа, хлорофиллаза, пектаза и др. Липаза расщепляет жиры с образованием глицерина и жирных кислот; щелочная фосфатаза гидролизует фосфорные эфиры, нуклеазы – нуклеиновые кислоты. Эстеразы обнаружены у большинства живых организмов: человека, животных, высших растений и микроорганизмов. Неспецифические эстеразы – неоднородная группа ферментов, отличающихся друг от друга по субстратной специфичности и действию активаторов и ингибиторов.

Установлено, что все неспецифические эстеразы локализованы в лизосомах. Фермент локализуется, как правило, в лизосомах цитоплазмы клеток и участвует в гидролизе алифатических эфиров. Изоферментный анализ неспецифической 1-эстеразы используют для определения сортов, гибридов, уточнения классификации и т.д. [54, 84]. В настоящее время наиболее изученной является флюоресцентная эстераза. Флюоресцентная эстераза (FE, КФ 3.1.1.2) катализирует реакции гидролиза сложноэфирных связей [18].

Другая группа ферментов, участвующая в расщеплении белковой связи, представлена аминопептидазами. Аминопептидазы гидролизуют пептид-

ные связи на “N”-конце молекулы белка. Известно 2 таких фермента: аланинаминопептидаза и лейцинаминопептидаза. Они обнаружены в тканях практически всех живых существ в растворенном или связанном с мембранами и внутриклеточными структурами виде. Немаловажную роль они играют в метаболизме белков, участвуя в заключительной стадии их расщепления. Данные ферменты благодаря их протеолитической активности часто используются для изучения первичной структуры белков. Лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1) получила широкое распространение в природе как маркер популяционно-генетической структуры. Лейцинаминопептидаза – представитель группы пептидаз, гидролизующих концевые NH₂-пептидные связи [18, 153, 164]. Не являясь строго специфичным в отношении лейцина, фермент действует в первую очередь на пептиды, у которых аминокислота на N-конце имеет не замкнутую в кольцо боковую цепь. И чем она длиннее, тем эффективность действия фермента выше. В качестве N-концевого звена в данном случае допускаются остатки не только лейцина, но и других аминокислот – тирозина, гистидина, триптофана и фенилаланина. В составе фермента также обнаружены ионы цинка.

В отличие от лейцинаминопептидазы аланинаминопептидаза отщепляет не любые “N”-концевые аминокислоты, а, как правило, только аланин. Аланинаминопептидаза (AAP, КФ 3.4.11.2) – фермент, локализованный на мембране, относящийся к классу пептидаз. Аланинаминопептидаза является экзопептидазой и высвобождает аминокислоту, локализованную на N-конце пептида, амида или акриламида. Аланинаминопептидаза может расщеплять пептидную связь всех остальных аминокислот, включая пролин, хотя с более низкой скоростью [153, 176].

В состав аланинаминопептидазы входят 966 аминокислот, молекулярная масса фермента – 109,5 кДа. В клетке образует димер. Фермент включает короткий N-концевой цитоплазматический участок. Внеклеточный участок включает 4 сульфотирозина, 1 фосфотреонин и 10 участков N-гликозилирования. Активный центр аланинаминопептидазы составляет ак-

цептор протона (остаток глутаминовой кислоты), трёх аминокислот, связывающих активный цинк и тирозина [109].

1.4. Биохимические методы в исследовании древесных пород растений

В качестве биохимико-генетических маркеров могут выступать следующие признаки:

– Морфологические [18]. У видов с длительным жизненным циклом, например у древесных пород растений, проведение биохимико-генетического анализа фенотипических признаков весьма затруднено, поскольку применение традиционного гибридологического метода потребовало бы десятилетий из-за продолжительной ротации поколений. Так, к началу 70-х годов доступными генетическими маркерами у древесных видов являлось лишь небольшое количество морфологических признаков, для которых был установлен моногенный контроль [58]. Главными недостатками таких маркеров являются весьма ограниченное их число, а также сложность проведения генетического анализа у древесных пород растений.

– Концентрация монотерпенов. Использование данного признака позволило решить вопросы систематики и филогении ряда растительных видов [93], а также вопросы определения устойчивости древесных растений к болезням и вредителям. В то же время этот метод имеет ряд недостатков. К основным из них относятся: хронологическая изменчивость содержания эфирных масел, например – сезонный полиморфизм [105]; полигенная детерминация биосинтеза терпеновых масел; использование дорогостоящего газожидкостного хроматографического анализа.

– Общие, водорастворимые и запасные белки. Использование общебелковых спектров в качестве генетических профилей для идентификации генотипов или сортов является дешевым и простым методом. Изменчивость по белковым спектрам может быть высокой даже среди близкородст-

венных видов. Исходя из этого, по мнению ряда авторов, применение данного метода не должно превышать уровень межвидового сравнения [82]. Использование белкового полиморфизма среди таксонов более низкого ранга позволяет эффективно решать вопросы, связанные с выявлением и анализом изменчивости. Однако данный тип маркеров характеризуется рядом недостатков: сходная электрофоретическая подвижность ряда белковых молекул; многофракционный характер электрофоретических спектров; онтогенетическая и тканеспецифическая изменчивость спектров. Исходя из выше перечисленных ограничений [82], данный метод не нашел широкого применения в лесном хозяйстве.

– Изоферменты. Данный тип маркеров практически не зависит от условий окружающей среды. Изоферменты обладают целым рядом преимуществ по сравнению с предыдущими классами биохимических маркеров [22, 73]: 1) методы электрофореза позволяют без чрезмерных временных затрат анализировать большое количество генов у многих растений; 2) практически все известные в настоящее время изоферменты проявляются кодоминантно, за исключением “нулевых” аллелей; 3) обладают практически 100% воспроизводимостью; 4) изоферменты могут быть проанализированы в различных тканях, включая взрослые и молодые листья, почки, пыльцу и семена; 5) изоферменты могут служить идеальным инструментом для прямого описания генотипической структуры природных и искусственных популяций. Данные, полученные за последние 15–20 лет, показали, что метод электрофоретического анализа изоферментов оказался одним из наиболее перспективных направлений для решения прикладных и фундаментальных вопросов генетики и биохимии древесных видов [73].

Но, как оказалось, механизм реализации генетической информации весьма сложен для детальной расшифровки. Это является причиной того, что изменения спектра изоферментов в процессе индивидуального развития растения описаны всего по единичным ферментам. Подробный анализ фенотипической экспрессии показал, что она контролируется не только активностью

соответствующих структурных генов, но и большой вклад вносят гены-модификаторы. Так же немаловажную роль играют мутации, возникающие в структурной части гена и способные оказывать влияние на биохимические показатели фермента: изменение активности, стабильность молекулы, сродство к субстрату [38]. Они способны вызывать нарушения в транскрипции, процессинге и трансляции гена. Если такие мутации возникают в регуляторных генах, то наблюдается влияние на функционирование самой молекулы белка (фермента) [38, 135].

К настоящему времени на основе биохимического анализа изоферментов установлены особенности структуры и уровень генетической изменчивости около 500 видов растений [73, 135, 147, 158]. При всех достоинствах изоферментов у них есть один недостаток – наличие ограниченного количества маркеров, что послужило поводом для поиска новых типов биохимических маркеров.

– ДНК-маркеры. Использование ДНК-маркеров открывает большие перспективы для детального картирования генетического материала хромосом, анализа и клонирования генов, конструирования новых сортов растений и др. Введение ДНК-маркеров в практику биохимических исследований позволило изучить генетическое разнообразие, определить степень родства организмов на внутри- и межвидовом уровнях [174]. Существенным преимуществом данной группы методов является непосредственный анализ структуры ДНК и большое количество выявляемых маркеров. ДНК-маркеры являются сборной группой методов, изучающих полиморфизм нуклеиновых кислот, которые рассмотрены ниже.

Изучение полиморфизма молекул ДНК основано на разнице нуклеотидных последовательностей сравниваемых образцов. Это различие может быть количественным (варьирование длины ДНК-фрагментов образцов) или качественным (изменчивость в последовательности нуклеотидов). В первом случае полиморфизм выявляется с помощью электрофоретического фракционирования, хроматографии, масс-спектрометрии образцов ДНК. Во вто-

ром случае анализ изменчивости базируется на ряде ДНК-технологий, которые, исходя из различных методических основ, можно разделить на три условные группы:

1) методы, в которых изучение полиморфизма основывается на комплементарном взаимодействии образцов ДНК с фрагментами, нуклеотидная последовательность которых заранее известна – RAPD, DAF, AP-PCR, SSR, ISSR, SCARs, CAPS, EST и др. [125, 167, 174];

2) методы, в которых скомбинировано использование принципов комплементарности и сайтспецифической рестрикции – AFLP, RFLP, PCR-RFLP, PCR-RFLP-SSCP и др. [113, 167, 174].

Каждый метод дает различные типы ДНК-маркеров, которые можно классифицировать на основании различных критериев [174]:

- 1) по характеру проявления (доминантный, кодоминантный);
- 2) по механизму передачи (обоеполюе наследование, наследование только по материнской или отцовской линии);
- 3) по локализации в геноме (ядерная ДНК, хлоропластная ДНК, митохондриальная ДНК и др.);
- 4) по уровню изменчивости (мономорфность, гипервариабельность).

В последнее время наибольшую популярность приобрели методы, в основе которых лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР) [36, 37, 63].

1.5. Биохимико-генетические исследования рода *Quercus*

1.5.1. Изоферментный анализ древесных растений

Для использования белков в качестве маркеров при изоферментном анализе были определены требования для применения этих маркеров с целью получения данных, которые наиболее объективно и точно отражают специфику структуры генофонда изучаемой группы организмов [50].

В настоящее время имеются обширные литературные сведения по изоферментному анализу различных видов рода *Quercus*. Так, например, S. Guttman и L. Weigt провели генетическую оценку 18 видов дуба, произрастающих на востоке Северной Америки [131]. Учеными были изучены такие виды, как *Q. alba*, *Q. bicolor*, *Q. falcata*, *Q. gambelii*, *Q. imbricaria*, *Q. laurifolia*, *Q. lyrata*, *Q. macrocarpa*, *Q. marilandica*, *Q. muehlenbergii*, *Q. nigra*, *Q. palustris*, *Q. phellos*, *Q. prinus*, *Q. rubra*, *Q. shumardii*, *Q. stellata*, *Q. velutina*, *Q. virginiana*. Сравнительный анализ параметров изменчивости показал, что в целом уровень генетического разнообразия в роде *Quercus* достаточно высок. Доля полиморфных локусов для проанализированных популяций колебалась в зависимости от вида в пределах 39–83%, а значения ожидаемой гетерозиготности варьируют от 14 до 40%. Поэтому величина генетического полиморфизма у дуба черешчатого характеризуется средним уровнем среди представителей рода *Quercus*. Наибольшими показателями по обоим параметрам характеризовался дуб *Q. prinus* [131].

В Европейских странах на основании использования изоферментного анализа были также изучены разные виды рода *Quercus*. P. Belletti и его коллеги [108] изучили насаждения четырех видов дуба (*Quercus petraea*, *Q. robur*, *Q. cerris* и *Q. pubescens*), произрастающих на северо-западе Италии [126].

На основании изоферментного анализа изучены насаждения пробкового дуба (*Quercus suber*), произрастающие в Испании, Португалии, Марокко и Италии [154]. Следует отметить, что, несмотря на достаточно низкие показатели генетического разнообразия (доля полиморфных локусов равна 64%, уровень ожидаемой гетерозиготности – 15,8%), в целом они были сходны со средними значениями для рода *Quercus* [173]. Было проведено сравнение насаждений, произрастающих в центральной части исследованного ареала и занимающих обширные территории с краевыми популяциями. Самым низким запасом генетической изменчивости характеризуются наиболее изолированные насаждения небольших размеров, в отличие от центральных лесов, где

присутствуют генетические механизмы, поддерживающие относительно высокий уровень разнообразия даже в случае некоторой обособленности отдельных насаждений. Межпопуляционная дифференциация (F_{ST}) составляет 3,3%, что указывает на значительные генные потоки или недавнее постледниковое расширение ареала [173].

Большое число исследований, основанных на использовании изоферментного анализа, направлены на изучение и сравнение таких видов как дуб черешчатый (*Quercus robur*) и дуб скальный (*Q. petraea*) [110, 111, 173]. Так, например, A. Zanettoetal [181] были изучены насаждения *Q. robur* и *Q. petraea*, представленные семью географическими парами (в одну пару входили насаждения разных видов) и распределенными по всей территории Европы (юго-запад Франции, юг Италии, Австрия, Словения, Сербия, Румыния и юг Норвегии). На основании использования 11 ген-ферментных систем, кодирующих 13 локусов, установлены лишь незначительные различия по аллельным частотам между видами, выявлены сходные уровни ожидаемой гетерозиготности (*Q. petraea* – 24,5%, *Q. robur* – 25,2%). Генетическая дифференциация между популяциями каждого вида в отдельности также характеризовалась низкими значениями как для дуба скального ($G_{ST} = 3,2\%$), так и для дуба черешчатого ($G_{ST} = 2,4\%$) [111]. В целом, межрегиональные межвидовые дистанции имели те же самые значения, что и местные (внутри одной географической пары) межвидовые дистанции. Это указывает на то, что дифференциация насаждений поддерживается сходным способом в различных географических областях Европы, за исключением Балкан (Словения и Сербия), где данные параметры были выше по сравнению с остальными географическими парами [111]. Эти результаты могли интерпретироваться двумя различными способами. С одной стороны, подобное равновесие может быть объяснено наличием внутривидового генного потока (между различными популяциями одного и того же вида) и локального межвидового генного потока. Эта гипотеза может быть подтверждена сходным уровнем внутривидовой и межвидовой дифференциации для всех локусов. С другой стороны,

внутривидовой и местный межвидовой генный потоки, возможно, могут быть уравновешены давлением отбора в пределах каждого вида, приводя к сходным аллельным частотам и профилям во всех популяциях данного вида. Кластеризация популяций осуществлялась в соответствии с их видовой принадлежностью [111].

В.В. Потенко и др. [69] на юге Дальнего Востока России проведено изучение генетической изменчивости и дифференциации популяций дуба зубчатого (*Q. dentate*) и дуба монгольского (*Q. mongolica*). Установлено, что у обоих видов наблюдаемая гетерозиготность практически не отличается от ожидаемой и составила 19,8% у дуба зубчатого и 16,1% у дуба монгольского. Генетическая дистанция Nei между видами составила 5,3%. Определено, что основной вклад в дифференциацию видов вносят локусы *Lap-1*, *Idh-1*, *Pgm-1* и *Ndh-1*[69]. Сходная степень генетической дифференциации характерна и для других близкородственных видов дуба – *Q. robur* и *Q. petraea* [10, 63], *Q. grisea* и *Q. gambelii* [116], *Q. petraea* и *Q. pubescens* [74]. В целом, учитывая морфологическую и экологическую обособленность видов друг от друга, было сделано предположение, что различия в генных частотах могут отражать действие отбора, направленного на адаптацию растений к различным условиям произрастания и противодействующего их гибридизации [163].

1.5.2. Анализ структуры ДНК древесных растений

В настоящее время при молекулярно-генетических исследованиях древесных растений особую значимость приобрели методы, основанные на изучении локусов хлДНК. Это обусловлено такими особенностями хлоропластного генома листовых растений, как: 1) наследование осуществляется только по материнской линии, что значительно сокращает величину генного потока для данного типа маркеров и придает полиморфизму хлДНК большую структурированность по сравнению с ядерным полиморфизмом; 2) хлоропластная ДНК характеризуется отсутствием рекомбинации генов и, следова-

тельно, низкой скоростью изменений, возникающих в процессе эволюции [174]. Вышеперечисленные свойства локусов хлоропластной ДНК дуба сделали их удобным инструментом для проведения исследований в области геногеографии видов рода *Quercus*.

На основании PCR-RFLP-анализа хлоропластной ДНК в комплексе с исследованием ядерных маркеров установлено, что во время последнего ледникового периода данный род существовал в виде трех изолированных рефугиумов (гаплотип А – Балканы, В – Испания, С – Италия), каждый из которых характеризовался генетической разнородностью по хлоропластным и ядерным генам. В результате последующего расселения дуба на север Европы и пыльцевого обмена между восточным и западным рефугиумами произошла постепенная спецификация ядерных геномов, возникли отдельные ветви расселения дуба. Все это привело к возникновению консервативных гаплотипов, по которым можно проследить ледниковую и постледниковую историю расселения видов рода *Quercus* [146].

Анализ хлоропластной ДНК из популяций *Quercus ilex*, расположенных на Иберийском полуострове, позволил Люмарету с соавторами [149] выявить две основные формы гаплотипов хлДНК. Одна распространена по всему восточному Средиземноморскому побережью, другая – по остальной части Иберийского полуострова. На основании этого авторы делают выводы о наличии в прошлом двух изолированных рефугиумов для данного вида [149]. Сходные исследования, посвященные геногеографии представителей рода *Quercus*, представлены в работах Олалде с соавторами [160] и Петита с соавторами [163].

Так, на основании данных, полученных в результате PCR-RFLP-анализа локусов хлоропластной ДНК дуба черешчатого и дуба скального, проведено генетическое картографирование данных пород на территории Польши. Проанализировав 33 популяции этих двух видов, было выявлено 9 гаплотипов, 5 из которых были известны ранее, 4 – обнаружены впервые. Авторы установили, что дубравы Польши имеют историческую связь с насаж-

дениями дуба таких стран как Германия, Франция, Италия, Испания, страны Балканского полуострова [50].

Исследования, проведенные в Швейцарии, установили наличие двух гаплотипов дуба черешчатого: западного, пришедшего из Италии, и восточного – из Балкан. Одновременно с анализом хлоропластных локусов был проведен изоферментный анализ исследуемых популяций с целью установления каких-либо закономерностей между историческим расселением дуба черешчатого и полиморфизмом локусов ядерной ДНК. Низкий уровень генетической изменчивости изоферментных локусов между популяциями с разными гаплотипами хлоропластной ДНК (следовательно, и различной историей послеледникового расселения) указал на отсутствие влияния ледниковой и постледниковой истории популяций на строение и структуру локусов ядерной ДНК [126].

Изучение генетической дифференциации и популяционной структуры вида является основой для обоснования и оптимизации возможного перемещения семян и мероприятий по сохранению генетического потенциала вида. В настоящее время широкое распространение для изучения генетической изменчивости различных видов растений, прежде всего в Европе, получили RAPD-маркеры [40]. Основное внимание было уделено изучению молекулярной дифференциации между двумя родственными видами – дубом скальным и дубом черешчатым. Несмотря на наличие существенной дифференциации между видами по фенотипическим признакам, молекулярные маркеры показывают очень невысокие различия между популяциями и даже видами. Из 45 испытанных праймеров только 7 дали профили, позволяющие выявить достоверные различия между двумя видами дуба по 14 фрагментам, полностью видоспецифических фрагментов установлено не было. Хотя и отмечена более высокая дифференцирующая способность RAPD-праймеров по сравнению с изоферментами, большое значение при работе с RAPD-маркерами имеет правильный выбор праймеров для решения поставленных задач [154]. Применение RAPD-маркеров, обладающих значительно более

высокой изменчивостью, чем изоферменты, является эффективным средством для изучения процессов генетической дифференциации и популяционной структуры дуба черешчатого и других лиственных древесных пород.

Важность выбора праймеров для оценки степени генетической дифференциации и возможности идентификации разных популяций друг от друга показана при изучении географических культур и популяций дуба в Германии и различных видов дуба в Венгрии. На основании использования RAPD-метода и на основе частот по двум, трем и четырем отдельным фрагментам ДНК оказалось возможным идентифицировать и распознать три популяции от остальных четырех изученных популяций в западной части Германии [173]. В Венгрии из проанализированных 26- и 10-мерных праймеров только четыре проявили существенные различия в частотных профилях у различных видов. Отсутствие или наличие отдельных фрагментов трех праймеров (G9, G13 и H2) оказалось видоспецифическим признаком для *Q. robur*, *Q. petraea* и *Q. dalechampii* соответственно [110]. При исследовании RAPD-методом насаждений дуба черешчатого, произрастающих в европейской части России, несмотря на наличие существенных достоверных различий в частотах отдельных фрагментов в разных популяциях, не удалось выделить какие-либо праймеры, идентифицирующие с высокой степенью достоверности отдельные популяции дуба [101].

Исследования популяций дуба черешчатого и скального в шести центрально и западноевропейских странах выявили достаточно высокий уровень меж- и внутривидовой изменчивости для обоих видов дуба. Среднее число аллелей на локус на видовом уровне составило 2, а эффективное число аллелей для обоих видов дуба – около 1,69. Для обоих видов генетическая изменчивость (H) изменялась в пределах от 0,30 до 0,50 (в среднем для *Q. petraea* – 0,389 и для *Q. robur* – 0,391), что свидетельствует о наличии аллелей с одинаковой частотой в популяциях [111]. Широкомасштабные исследования генетической изменчивости дуба скального с помощью молекулярных маркеров выявили высокую степень корреляции между генетическими дис-

танциями, рассчитанными на основании RAPD-маркеров, и географическими расстояниями между популяциями. Внутрипопуляционная генетическая изменчивость H_S изменяется от 0,189 (Чехия) до 0,258 (Центральная Франция), общая генетическая изменчивость составила 0,239, коэффициент генетической дифференциации 0,024 [110]. Оценки генетической изменчивости популяций дуба в России примерно такие же. На уровне вида средняя внутрипопуляционная генетическая изменчивость (H_S) составляет 0,227, а общее генетическое разнообразие H_T – 0,250 [101].

При анализе межпопуляционной дифференциации при помощи праймеров SCAR, дифференцирующих два вида дуба, были установлены высокие значения коэффициентов популяционной дифференциации G_{ST} на видовом уровне как для *Q. petraea* (0,124), так и для *Q. robur* (0,129). Сделан вывод, что регионы ДНК, характерные для данных видов, отличаются крайне высокой изменчивостью [111]. Также высокая межвидовая популяционная дифференциация выявлена в популяциях Польши, Германии и северо-восточной Франции, в которых оценки показателя G_{ST} изменялись в пределах от 0,223 (Польша) до 0,289 (Германия). Таким образом, делается вывод о наличии широтного тренда по степени дифференциации между видами. Во всех исследованиях подтверждается предположение, что поток генов является существенным гомогенизирующим генетическим фактором, который приводит к уменьшению дифференциации между популяциями.

Петит с соавторами [163] на примере дуба черешчатого и дуба скального в Западной Европе показали, что вклад в общую генетическую изменчивость доли межпопуляционной вариабельности ДНК клеточных органелл на порядок величин больше, чем аллозимной изменчивости.

Вся ценность генетического типирования состоит в том, что оно позволяет достоверно определить таксономическую принадлежность организмов вплоть до уровня популяции, штамма; оценить уровень полиморфизма, его изменение, что важно для разработки мероприятий по сохранению биоразнообразия в дикой природе [4].

ДНК-маркеры позволяют выявлять полиморфизм ДНК на уровне генов, а не на уровне продуктов генов. Кроме того, ДНК-маркеры позволяют использовать любые ткани и органы для анализа [11, 16, 77].

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Цель и задачи исследования

Целью данной работы явилось изучение белкового спектра ферментов метаболических путей клетки и молекулярных маркеров в популяции древесных растений дуба черешчатого (*Quercus robur L.*), произрастающих в условиях разных мест обитания.

Для выполнения поставленной цели в программу исследований были поставлены следующие задачи:

- 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 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.

2.2. Объекты и методы исследования

2.2.1. Объекты исследования

Объектами научных исследований в настоящей работе явились 8 ферментов, участвующих в метаболических путях растений: аланинаминопептидаза (ALAP, КФ 3.4.11.2), алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1), глюкозофосфатизомераза (GPI, КФ 5.3.1.9), изоцитратдегидрогеназа (IDH, КФ 1.1.1.42), лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1), флюоресцентная эстераза (FI-EST, КФ 3.1.1.2), фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1), шики-

матдегидрогеназа (SKDH, КФ 1.1.1.25), а также спектры амплифицированных фрагментов с использованием 4 RADP- праймеров (Oligo 16, Oligo 29, Oligo 4, Oligo 6) для инвертированных повторов в ДНК.

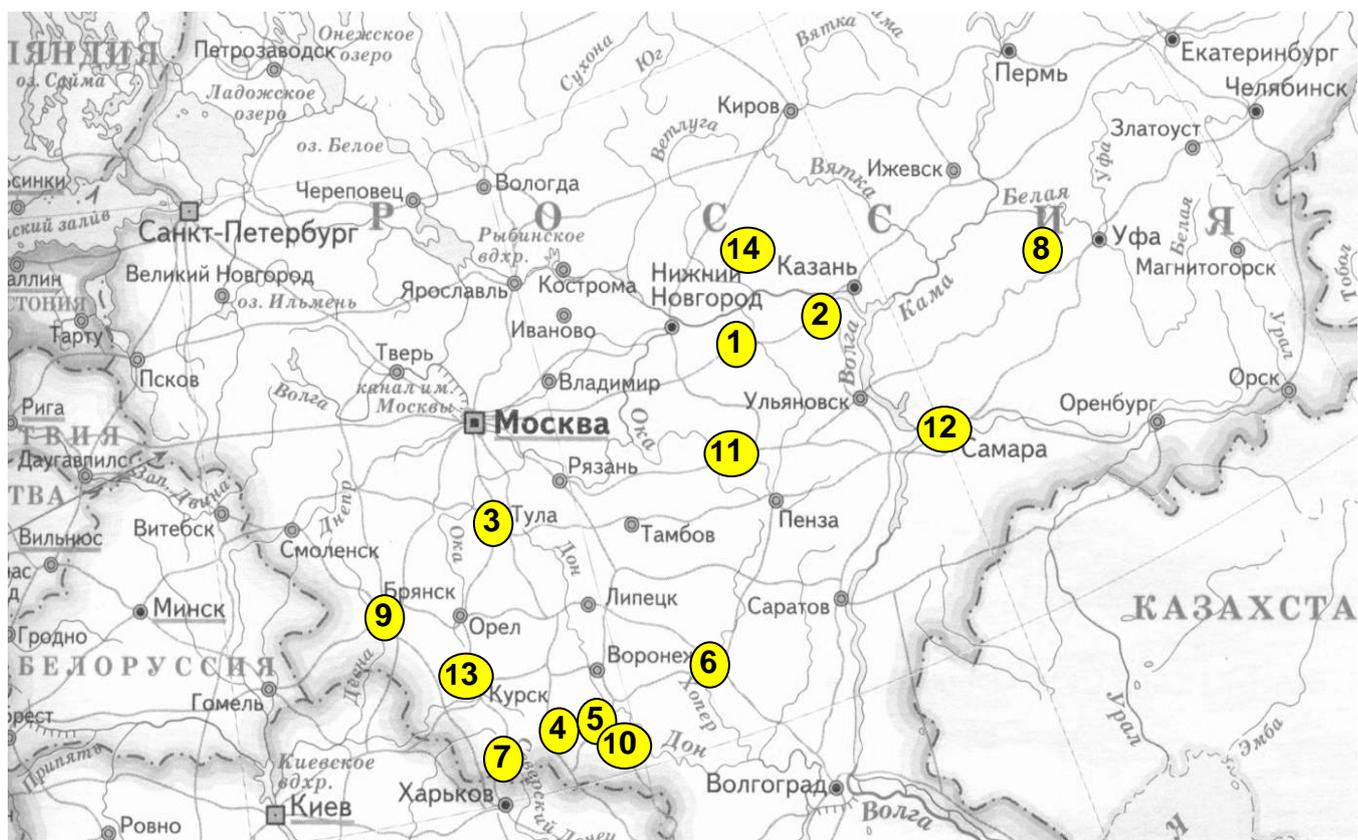
Выявление полиморфизма биохимических маркеров у дуба черешчатого и дивергенции популяций в естественном ареале осуществлялось путем анализа потомств дуба черешчатого в географических культурах, расположенных на территории России, заложенных А.М. Шутяевым в 1973 г. на площади 14, 8 га., где представлено 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 происхождения из лесостепи европейской части Российской Федерации (таблица 1, рис. 3).

Таблица 1 – Характеристика образцов дуба черешчатого, отобранных для анализа

Номер по Госреестру	Местонахождение: республика, область, лесхоз	Тип условий местопроизрастания, 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

Продолжение таблицы 1

Номер по Госреестру	Местонахождение: республика, область, лесхоз	Тип условий местопроизрастания, тип леса	Феноформа	Класс бонитета
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 су-борь	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, Гуймазинский	D ₂ , липовая дубрава	Ранняя	III
27	Россия, Самарская, быв. Куйбышевский	D ₂ , пристепная дубрава	Ранняя	III
48	Россия, Чувашия, Порецкий	D ₂ , папоротниковая дубрава	Ранняя	II-III



1 – 48 (номер плантации в географических культурах согласно Государственному реестру); 2 – 23; 3 – 6; 4 – 19; 5 – 13; 6 – 15; 7 – 18; 8 – 24; 9 – 20; 10 – 12; 11 – 22; 12 – 27; 13 – 17; 14 – 21

Рис. 3 – Места сбора репродуктивного материала дуба черешчатого

2.2.2. Методы исследования

2.2.2.1. Определение изоферментного состава

Изоферментный анализ проводился с использованием метода электрофореза в крахмальном геле [22, 74, 116].

Для экстракции ферментов при анализе деревьев дуба черешчатого использовались как наиболее крупные почки, так и ткани 2–5-дневных побегов. Перед гомогенизацией почку очищали от покровных чешуй; вес подготовленного образца составлял 35–40 мг.

Гомогенизация растительных тканей проводится при температуре от 0 до 5°C в экстрагирующем растворе, который имеет следующий состав: поливинилпирролидон – 8%, сахароза – 0,3 М, ЭДТА – 0,5 мМ, дитиотрейтол – 1 мМ, аскорбиновая кислота – 1 мМ, альбумин (бычий) – 0,1%, никотинамидадениндинуклеотид (НАД) – 0,4 мМ, никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) – 0,3 мМ, пиридоксаль-5-фосфат – 0,2 мМ.

Электрофоретическое фракционирование изоферментов осуществлялось в крахмальном геле. Для выявления белковых зон каждой ферментной системы применялись специальные окрашивающие растворы (приложение 1) [74].

Для обозначения аллельных изоферментов (аллозимов) и кодирующих их аллельных генов использовали цифровые символы, отражающие относительную электрофоретическую подвижность. Значение 1.00 соответствует электрофоретической подвижности аллеля данного гена, наиболее часто встречающегося в природных популяциях исследованного вида. Все остальные аллели этого же локуса обозначаются в соответствии с электрофоретической подвижностью их аллозимов относительно аллеля 1.00 [74].

2.2.2.2. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК

2.2.2.2.1. Получение нуклеиновых кислот

В настоящей работе для получения препаратов тотальной ДНК использовался метод с применением ЦТАБ-буфера (цетилтриэтиламмония бромид) [41, 122]. Для выделения ДНК применяли ЦТАБ-буфер следующего состава: 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 20 мМ EDTA, 3% ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 0,2% 2-меркаптоэтанол.

2.2.2.2.2. Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК

Показатели концентрации и чистоты препарата ДНК являются значимыми факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа [29]. Для измерения количества ДНК определяют поглощение раствора нуклеиновых кислот в областях спектра с длинами волн 260 и 280 нм [150]. Кроме того, проводят дополнительное оптическое измерение препаратов при 320 нм. В чистых препаратах значение D_{320} должно стремиться к нулю.

Спектрофотометрический анализ ДНК позволяет определить концентрацию и оценить степень чистоты полученных препаратов. Однако он не позволяет делать выводы о степени деградации молекул нуклеиновых кислот. Для решения подобной задачи, как правило, используют электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в электрическом поле [29, 150].

2.2.2.2.3. Полимеразная цепная реакция

Полученные образцы ДНК используют для реакции амплификации с целью обнаружения схожих сайтов в нуклеотидной последовательности образцов. Участок исследуемой ДНК гибридизуют с искусственно синтезированным праймером – олигодезоксирибонуклеотидными последовательностями длиной от 10 до 30 пн.

Состав реакционной смеси, используемой для ПЦР: смесь 10 мМ нуклеотидтрифосфатов, 2,5 мкл 10*ПЦР буфера (500 мМ КСl, 100 мМ Трис-НСl; рН 8,8), 25 мМ MgCl₂, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы, 10 мМ праймера и 1 мкл ДНК (20 нг/мкл).

2.2.2.2.4. Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР

Для визуализации полученных ампликонов проводили электрофорез в 2% агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя – бромистого этидия.

2.2.2.3. Математическая обработка полученных результатов

Доля полиморфных локусов, или полиморфность (P) – параметр, определяющий степень генетической изменчивости в популяциях. Она определяется отношением числа полиморфных локусов (имеющих два и более различных аллеля) к общему количеству проанализированных локусов. Данная величина обычно определяется по двум критериям полиморфности. Лocus относится к полиморфным, когда частота наиболее общего аллеля этого локуса не превышает 95% (P_{95}), или когда его частота не превышает 99% (P_{99}) [74].

При генетическом анализе популяций широко используется также показатель, называемый средним числом аллелей на locus (A). Для вычисления этого параметра общее число обнаруженных в исследовании аллелей делится на количество локусов. Так как A сильно зависит от выборки деревьев, часто используются еще и показателем среднего числа нередких аллелей на locus ($A_{1\%}$). 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 locus позволяют дать усредненную оценку аллельного разнообразия, характерного для той или иной популяции, а также для вида в целом.

Необходимо отметить, что эти показатели зависят от выборки проанализированных деревьев и, вследствие этого, не всегда точно отражают уровень генетической изменчивости в исследованных популяциях.

Более совершенными мерами, оценивающими уровень генетической изменчивости в популяциях, являются параметры гетерозиготности (наблюдае-

мой и ожидаемой). Показатель наблюдаемой гетерозиготности (H_o) рассчитывается для каждого локуса отдельно как отношение числа гетерозигот к общему количеству проанализированных особей. Параметр ожидаемой гетерозиготности (H_e) вычисляется для каждого локуса на основании его аллельных частот, исходя из формулы Харди-Вайнберга, посредством следующего соотношения [142]:

$$H_e = 1 - \sum x_i^2, \quad (1)$$

где x_i – частота i -того аллеля.

Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности вычисляются как среднеарифметическое показателей H по всем локусам [142]:

$$\bar{H} = \frac{1}{L} \sum H_j, \quad (2)$$

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

Ошибку средней гетерозиготности рассчитывали по формуле [90]:

$$S = \frac{1}{L} \sqrt{\frac{H_1(1-H_1)}{n_1} + \dots + \frac{H_L(1-H_L)}{n_L}}, \quad (3)$$

где L – количество проанализированных локусов, H – показатель гетерозиготности по отдельному локусу, n – количество исследованных особей.

Все вышерассмотренные параметры, а также частоты встречаемости аллелей, позволяют описать генетическую и генотипическую структуру, выявить уровень генетической изменчивости и тем самым дают возможность оценить состояние генофонда исследуемых видов и популяций.

Для анализа степени подразделенности природных популяций дуба черешчатого использовались коэффициенты, предложенные Райтом (F-статистики) и Неи (G-статистики).

Для расчета F-статистик Райта использовались значения аллельных частот, а также показателей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности [115, 120].

Коэффициент инбридинга для отдельного локуса (F) вычислялся по формуле:

$$F = 1 - H_o / H_e, \quad (4)$$

где H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность [121].

Показатель F_{IS} (коэффициент инбридинга особи (I) относительно популяции или субпопуляции (S)) для одного локуса вычислялся по формуле:

$$F_{IS} = \sum_{q=1}^K (N_q / N_t) F_q, \quad (5)$$

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.

После вычисления F_{IS} для каждого локуса рассчитывалось усредненное значение этого показателя для всех проанализированных локусов.

Показатель F_{ST} (коэффициент инбридинга популяции или субпопуляции (S) относительно всего вида (T)), который собственно и определяет степень подразделенности, для каждого локуса вычислялся в два этапа [171].

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

$$F_{STi} = \frac{\sigma_{Xi}^2}{x_i (1 - x_i)}, \quad (6)$$

где x_i – взвешенная средняя частота i -того аллеля по всем исследованным популяциям; σ_{Xi}^2 – взвешенная сумма квадратичных отклонений частот i -того аллеля в популяциях от средней частоты этого аллеля, или в математическом выражении:

$$\sigma_{Xi}^2 = \sum_{q=1}^K (N_q / N_t) (x_{iq} - \bar{x}_i)^2, \quad (7)$$

где x_{iq} – частота i -того аллеля в q -той популяции.

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

$$F_{ST} = \frac{1}{R} \sum_{i=1}^R F_{STi}, \quad (8)$$

где R – количество аллелей в локусе.

Таким образом, значения F_{ST} рассчитывались в отдельности для каждого локуса, после чего усреднялись по всем проанализированным локусам.

Еще один показатель Райта – F_{IT} (коэффициент инбридинга особи (I) относительно вида в целом (T)) – рассчитывался на основании значений F_{IS} и F_{ST} . Эти три показателя связаны между собой следующей формулой:

$$F_{IT} = F_{IS} + (1 - F_{IS}) F_{ST}. \quad (9)$$

G -статистики состоят из нескольких параметров. Основными являются: H_S – среднее генетическое разнообразие внутри популяции, H_T – общее генетиче-

ское разнообразие, D_{ST} – генетическое разнообразие между популяциями и G_{ST} – доля межпопуляционного разнообразия.

Общее генетическое разнообразие (H_T) для каждого локуса вычислялось на основании средних частот аллелей:

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^R x_i^{-2}, \quad (10)$$

Среднее генетическое разнообразие внутри популяции (H_S) для определенного локуса рассчитывалось как средневзвешенное значение показателя ожидаемой гетерозиготности по всем изученным популяциям:

$$H_S = \sum_{q=1}^K (N_q / N_t) H_{eq}, \quad (11)$$

где H_{eq} – ожидаемая гетерозиготность в q-той популяции.

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

(12)

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

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

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T. \quad (13)$$

Данные параметры G-статистик вычислялись отдельно для каждого локуса, а потом усреднялись по всем локусам [132, 138, 141].

Степень генетической близости между исследованными популяциями рассчитывали по методу, предложенному Неи (D_N) [143]:

$$D_N = -\ln I_N \quad (14)$$

(4)

$$I_N = \frac{\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij} y_{ij}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij}^2\right) \left(\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R y_{ij}^2\right)}}, \quad (15)$$

где I_N – коэффициент генетического сходства, x_{ij} , y_{ij} – частоты i -того аллеля j -того локуса в сравниваемых популяциях.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. 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, руководствовались рекомендациями, разработанными в «НИИ Леса» НАН Беларуси [74] (таблица 2).

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 (рис. 4–18). К таким ферментам относятся: алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1), аламинаминопептидаза (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).

Таблица 2 – Ферменты, используемые для молекулярно-генетического анализа древесных растений

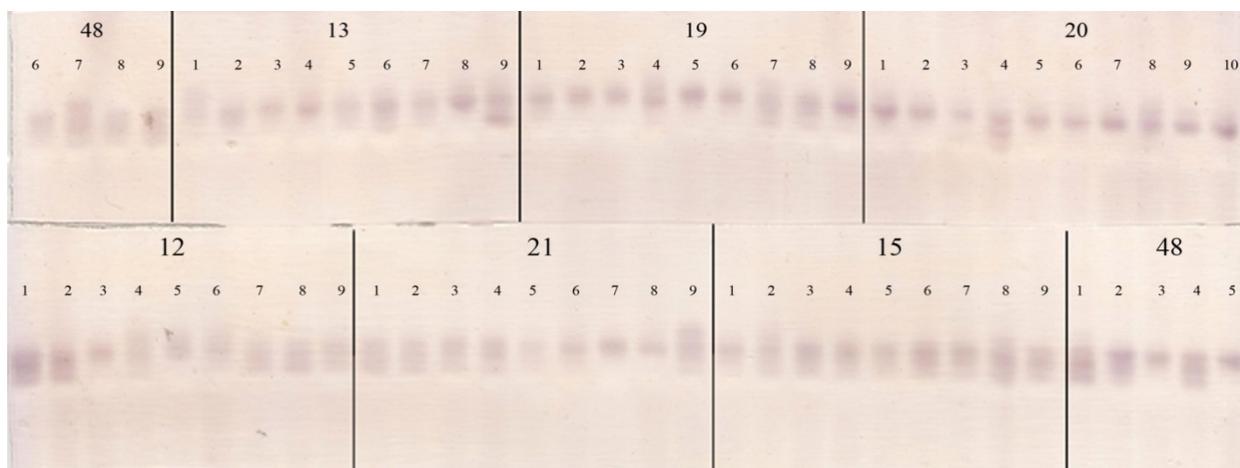
Фермент	Аббревиатура	Кодовый номер фермента	Анализируемый древесный вид									
			Сосна обыкновенная	Ель европейская	Берёза повислая и пушистая	Граб обыкновенный	Дуб черешчатый	Клён остролистный	Липа мелколистная	Ольха чёрная	Осина	Ясень обыкновенный
Аконитаза	ACO	4.2.1.3.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Аланинаминопептидаза	ALAP	3.4.11.2.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Алкогольдегидрогеназа	ADH	1.1.1.1.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Аспаргатаминотрансфераза	AAT	2.6.1.1.	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Глутаматпируваттрансаминаза	GPT	3.4.11.2.	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.1.2.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	G-6-PD	1.1.1.49.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Глюкозофосфатизомераза	GPI	5.3.1.9.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Диафораза	DIA	1.6.4.3.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37.	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Малик-энзим	ME	1.1.1.40.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Пептидаза	PEP	3.4.13.1.	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Пероксидаза	PER	1.11.1.7.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Флюоресцентная эстераза	FI-EST	3.1.1.2.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Шикиматдегидрогеназа	SKDH	1.1.1.25.	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

3.1.1. Алкогольдегидрогеназа

Известно, что в анаэробных условиях протекает процесс спиртового брожения. В результате данного процесса пировиноградная кислота в дальнейшем подвергается декарбоксилированию, и образовавшийся уксусный альдегид восстанавливается водородом. Данный процесс катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой (ADH, КФ 1.1.1.1). Он участвует в процессе восстановления ацетальдегида до этанола [64, 176].

Алкогольдегидрогеназа — фермент класса дегидрогеназ, катализирует окисление спиртов и ацеталей до органических соединений карбонильной группы — альдегидов и кетонов.

Установлено, что электрофореграмма белкового спектра фермента алкогольдегидрогеназы у дуба черешчатого характеризуется наличием двух аллозимных локусов: Adh-1 и Adh-2 [74] (рис. 4, 5).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 4 – Электрофореграмма белкового спектра алкогольдегидрогеназы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 5 – Электрофореграмма белкового спектра алкогольдегидрогеназы

В исследованной группе образцов локус *Adh-1* проявляется на геле в виде двух белковых зон с Rf 1,00 и 0,85, а локус *Adh-2* в виде трех белковых зон с Rf 1,15, 1,00 и 0,90.

Анализ белковых зон по климатипам выявил следующую зависимость в структуре спектра алкогольдегидрогеназы: климатип 48 (Республика Чувашия) по локусу *Adh-1* характеризуется наличием большого количества сочетания двух белковых зон 1,00 и 0,85, которые были выявлены в 78% образцов данного климатипа. У 22% образцов наблюдалась только одна белковая полоса с Rf 1,00. Аналогичная ситуация по этому локусу наблюдалась также у климатипа 12 (Воронежская обл. Воронцовское лесничество). Климатипы 6 (Тульская область), 24 (Республика Башкортостан) и 21 (Республика Марий-Эл) по данному локусу в 67% имели две белковых зоны (1,00 и 0,85), климатипы 23 (Республика Татарстан), 13 (Воронежская обл. Воронцовское лесничество), 22 (Республика Мордовия) и 17 (Курская область) в 45%, климатипы 19 (Белгородская область, Алексеевское лесничество), 18 (Белгородская область, Шебекинское лесничество) в 34%, а климатип 27 (Самарская область) в 23% имели подобные генотипы. Наибольшее и наименьшее значение дан-

ного параметра (100% и 10%) было обнаружено у образцов дуба черешчатого из Воронежской области, Теллермановского лесничества и Брянской области соответственно.

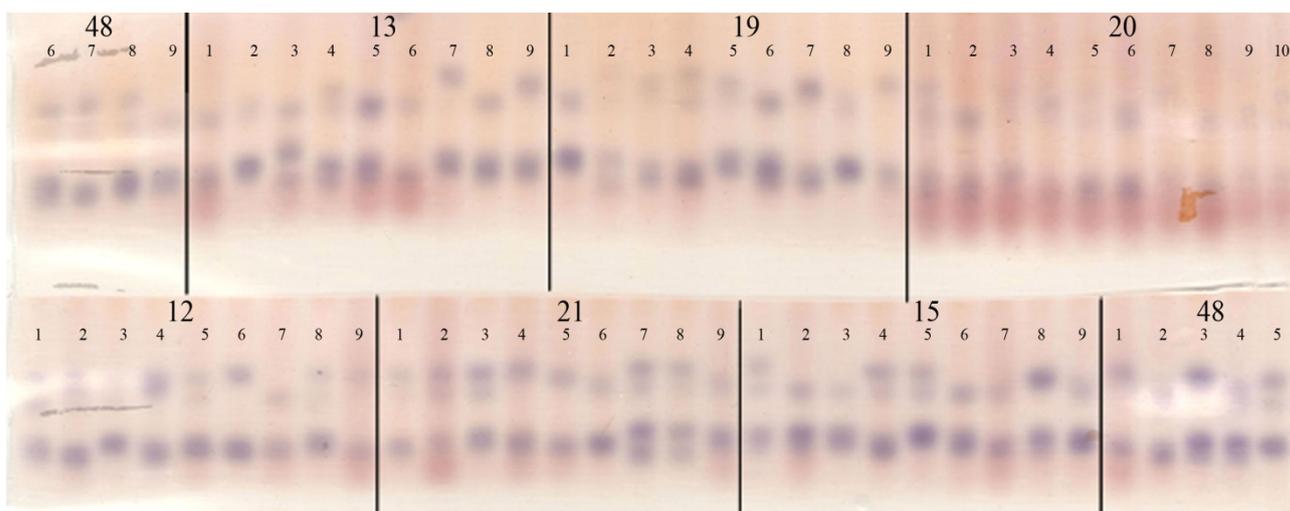
По локусу Adh-2 наиболее часто встречаемой была белковая зона с Rf 1,00, но помимо этого были выявлены и другие более редкие варианты. Так, например, у климатипов 48, 19, 13, 15, 18, 24, 20, 12, 21, 17, 22 в 11% – 34% встречается аллель 1,15, у климатипов 23, 6, 24, 22 обнаруживается аллель 0,90 в 10% -11%.

Обобщив данные по белковому спектру алкогольдегидрогеназы, можно заключить, что данный фермент проявляет высокую вариабельность и информативность и может быть рекомендован в качестве маркера для выявления внутривидовой структуры у дуба черешчатого.

3.1.2. Аланинаминопептидаза

Аланинаминопептидаза (ААР, КФ 3.4.11.2) представляет собой мембранлокализованный фермент, относящийся к классу пептидаз. Аланинаминопептидаза является экзопептидазой и высвобождает аминокислоту, локализованную на N-конце пептида, амида или акриламида. Данный фермент может расщеплять пептидную связь всех остальных аминокислот, но с более низкой скоростью [153, 176].

Известно, что на электрофореграмме белкового спектра фермента аланинаминопептидазы у дуба черешчатого выявляются два аллозимных локуса: Alap-1и Alap-2 [74] (рис. 6, 7).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 6 – Электрофореграмма белкового спектра аланинаминопептидазы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 7 – Электрофореграмма белкового спектра аланинаминопептидазы

В исследованной группе образцов локусы Alap-1 и локус Alap-2 проявляются на геле в виде трех белковых зон каждый с Rf 1,00, 0,95, 0,90 и 1,05, 1,00, 0,95 соответственно.

Анализ белковых зон по климатипам выявил следующую зависимость в структуре спектра: локус Alap-1 характеризуется наличием большого количества различных вариантов сочетания белковых зон. Так, например, сочетание аллелей 1,00/0,90 обнаруживается в 34% – 45% исследуемых образцах. Распределение по климатипам данного показателя примерно одинаково, за исключением образцов из Воронежской и Самарской областей, где сочетание аллелей 1,00/0,90 встречалось в 11% случаев или вообще отсутствовало (Воронежская область).

Помимо этого были обнаружены и другие аллельные варианты: 0,95/0,90 и 1,00/0,95, а также единичные варианты аллелей 1,00, 0,90 и 0,95. На долю таких сочетаний приходилось в среднем от 5% до 20%.

Локус Alap-2 также характеризуется высокой гетерогенностью и наличием большого количества сочетаний аллелей. Так, на долю единичных вариантов аллелей приходится от 26% до 58%. Данная зависимость выявлена у всех исследованных климатипов дуба черешчатого.

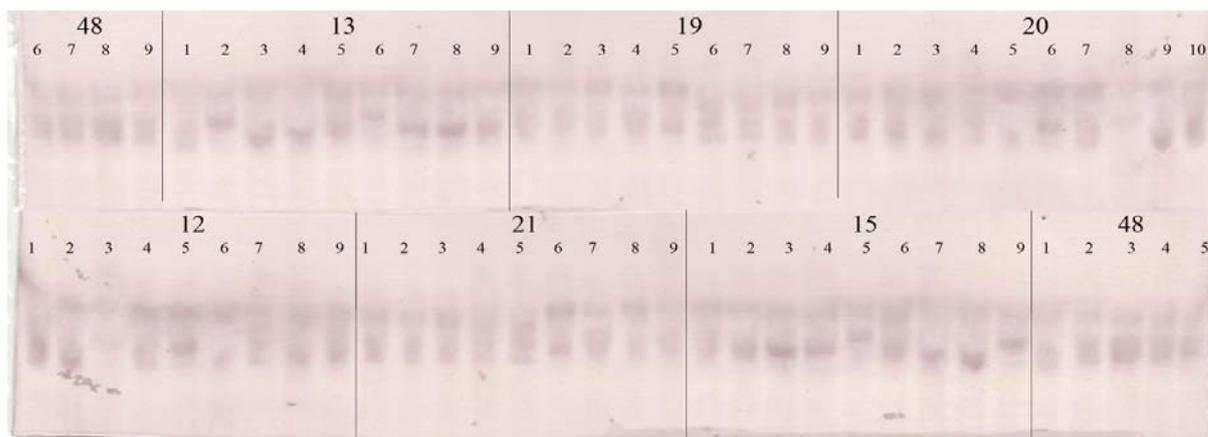
Белковый спектр аланинаминопептидазы проявляет высокую варибельность, что позволяет использовать данный фермент в качестве маркера для идентификации внутрипопуляционной структуры у дуба черешчатого.

3.1.3. Исоцитратдегидрогеназа

Исоцитратдегидрогеназа (ИДН, КФ 1.1.1.42.) – фермент цикла Кребса, катализирует обратимую реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата [64]. Процесс превращения изоцитрата в 2-оксоглутарат является лимитирующим скорость всего цикла. Данный фермент встречается как в митохондриях, так и в цитозоле, что связано с регуляцией цикла, сама изоцитратдегидрогеназа ингибируется НАДН и активируется цитратом. Актив-

ность фермента зависит от присутствия ионов кальция. Исоцитратдегидрогеназа – один из наиболее распространенных популяционно-генетических маркеров, представляющий собой чаще всего сложный гетерополимер [64, 76].

Исоцитратдегидрогеназа в своем белковом спектре представлена одним локусом [74], состоящим из нескольких белковых зон с Rf 1,30, 1,15 и 1,00 (рис. 8, 9).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 8 – Электрофореграмма белкового спектра изоцитратдегидрогеназы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 9 - Электрофореграмма белкового спектра изоцитратдегидрогеназы

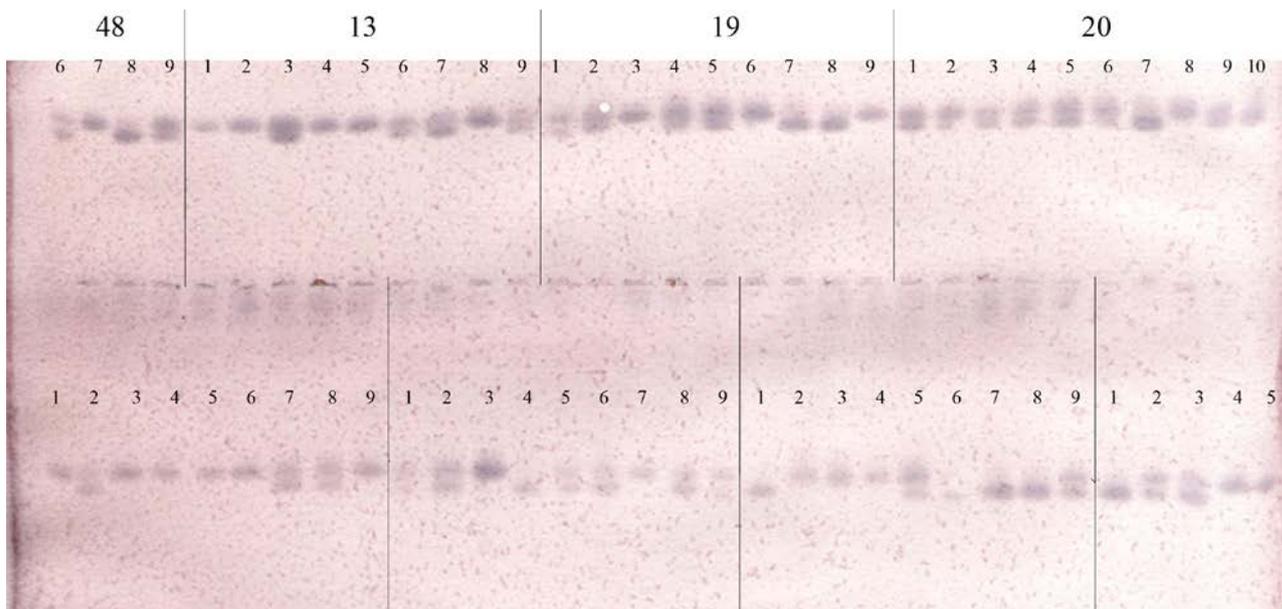
Анализ изоферментного состава изоцитратдегидрогеназы у дуба черешчатого показал, что в ряде случаев (климатип 48 (Республика Чувашия) и 23 (Республика Татарстан)) полиморфизм белкового спектра внутри климатипов не наблюдается, вся выборка была гомогенна. Данное явление можно объяснить близким родством деревьев, с которых был собран материал для анализа. Но следует отметить, что наблюдалось четкое различие между этими климатипами. Так, образцы из Республики Чувашии имели сочетание аллелей 1,00/1,15, а материал из Республики Татарстан характеризовался одной белковой полосой с Rf 1,00. Остальные климатипы по данному ферменту проявляют достаточно высокую степень полиморфизма как внутри одного, так и между разными климатипами. Наиболее часто встречаемое сочетание аллелей 1,00/1,15 было выявлено в среднем в 38% изученных образцов. На долю мономорфных аллелей в среднем приходилось 51% от общего количества образцов.

3.1.4. Фосфоглюкомутаза

Фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1). Фермент класса трансфераз катализирует внутримолекулярный перенос фосфата при образовании глюкозо-6-фосфата из глюкозо-1-фосфата в процессе гликолиза в реакции, следующей за фосфоролизом гликогена. Данный фермент локализован в цитоплазме. Молекулярная масса белковой молекулы 60 000 – 112 000 кДа. Активность фермента зависит от присутствия ионов магния.

В клетках одного организма фосфоглюкомутаза может присутствовать в виде различных изоферментов. Фосфоглюкомутаза широко распространена в растительных, животных и микробных клетках [6].

Белковый спектр данного фермента представлен несколькими аллельными вариантами (Rf 1,00, 0,90, и 0,80) по одному локусу Pgm [74] (рис. 10, 11).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 10 – Электрофореграмма белкового спектра фосфоглюкомутазы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 11 – Электрофореграмма белкового спектра фосфоглюкомутазы

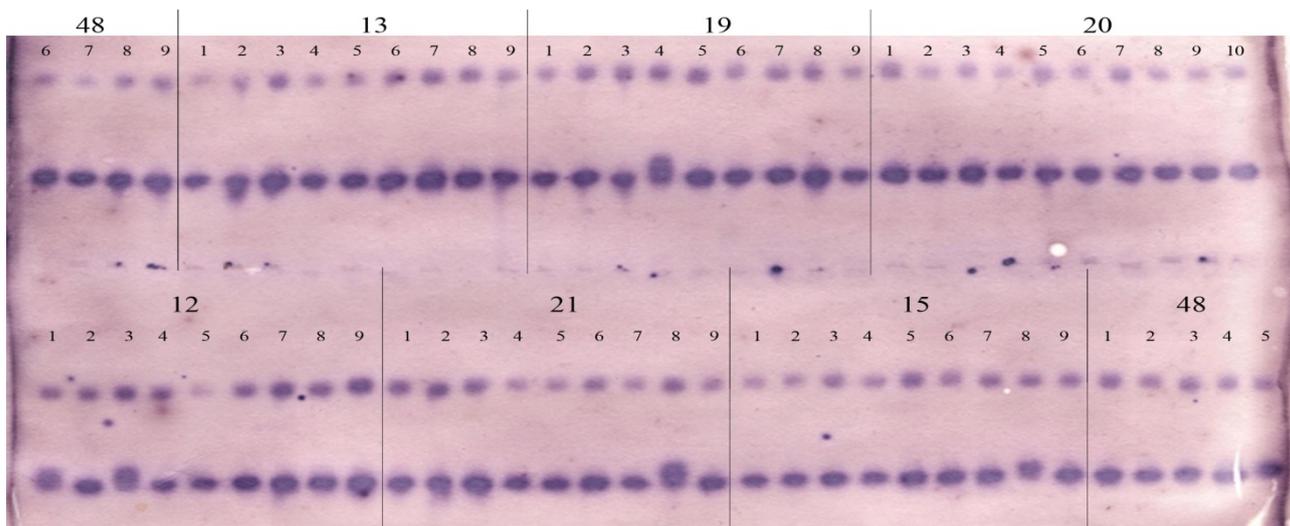
Сочетание белковых зон 1,00/0,90 встречается во всех группах исследованных образцов и составляет от 22% (климати́пы 48 (Республика Чувашия) и 22 (Республика Мордовия)) до 67% (климати́п 19 (Белгородская область)), в то время как аллельный вариант 1,00/0,80 обнаруживается только в трех (Самарская, Тульская области и Республика Башкортостан) у 11%–25% исследуемых образцов.

Изоферментный анализ фосфоглюкомутазы показал наличие высокой доли полиморфных белковых зон и может быть использован для определения внутривнутрипопуляционной структуры дуба черешчатого.

3.1.5. Глюкозофосфатизомераза

Глюкозофосфатизомераза (GPI, КФ 5.3.1.9) является важным ферментом для регуляции углеводного обмена наряду с другими факторами. Данный фермент регулирует количество глюкозо-6-фосфата, поступающего в гликолиз [18].

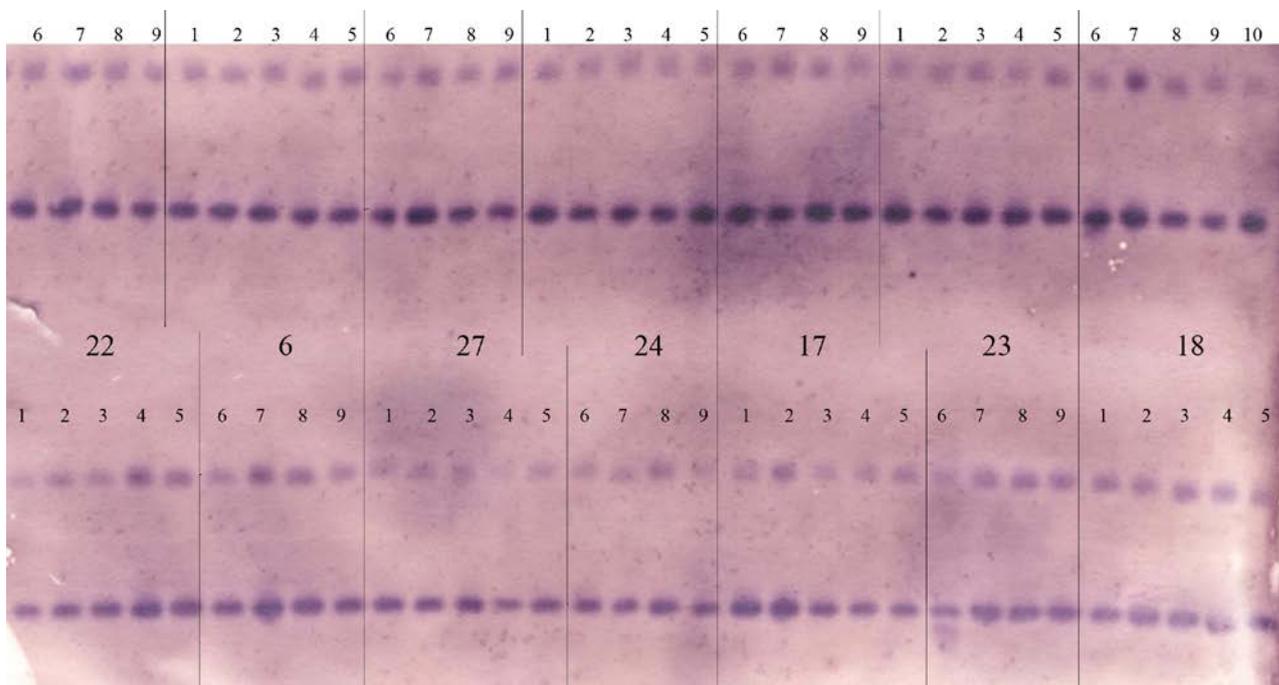
Известно, что электрофореграмма белкового спектра фермента глюкозофосфатизомеразы у дуба черешчатого характеризуется наличием двух аллозимных локусов: Gpi-1 и Gpi-2 [74] (рис.12, 13).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 12 – Электрофореграмма белкового спектра глюкозофосфатизомеразы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 13 - Электрофореграмма белкового спектра глюкозофосфатизомеразы

В исследованной группе образцов локус Gpi-1 проявляется на геле в виде одной белковой зоны с Rf 1,00, а локус Gpi-2 в виде трех белковых зон с Rf 1,15, 1,10 и 1,00.

Анализ белковых зон по климатипам показал высокую степень мономорфности по данному ферменту. Так, по локусу Gpi-1 во всех исследуемых образцах была выявлена только одна зона с Rf 1,00. Локус Gpi-2 также показал большую степень однородности, но, в отличие от первого локуса, проявлялся в виде трех полос. Стоит отметить, что данная ситуация наблюдалась только в нескольких климатипах: 48 (Республика Чувашия), 19 (Белгородская область), 12 (Воронежская область, Воронцовское лесничество) и 21 (Республика Марий Эл). Доля полиморфных аллельных вариантов в этих климатипах составляла от 11% до 23%.

Результаты, полученные по изоферментному анализу глюкозофосфатизомеразы у дуба черешчатого, показывают, что данный фермент не может быть использован в качестве маркера для выявления внутривидовой структуры, поскольку проявляет высокую мономорфность в белковом спектре.

3.1.6. Шикиматдегидрогеназа

Шикиматдегидрогеназа (SKDH, КФ 1.1.1.25) представляет собой фермент, окисляющий шикимовую кислоту. Шикимовая кислота является предшественником ароматических аминокислот, алкалоидов и других ароматических метаболитов и играет важную роль в метаболизме растений при адаптации к стрессовым условиям окружающей среды.

Изоферментный спектр данного фермента характеризуется наличием одного локуса Skdh, который может быть представлен тремя белковыми зонами с Rf 1,10, 1,00 и 0,90 [74] (рис. 14, 15).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.
 1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 14 – Электрофореграмма белкового спектра шикиматдегидрогеназы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.
 1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 15 – Электрофореграмма белкового спектра шикиматдегидрогеназы

Анализ белковых зон по климатипам выявил значительную степень моно-
 морфности у исследуемых образцов по данному ферменту. Практически все

климатипы (98%) были представлены одним аллелем 1,00. Исключение составили четыре климатипа: 15 (Воронежская область, Теллермановское лесничество), 18 (Белгородская область), 12 (Воронежская область, Воронцовское лесничество) и 17 (Курская область). Климатипы 15 и 18 характеризуются наличием аллельного варианта 1,00/1,10, который был обнаружен в 11% образцов. В выборке из климатипов 12 и 17 был обнаружен аллельный вариант 1,00/0,90, содержание которого так же составило 11%.

Полученные данные по белковому спектру шикиматдегидрогеназы показывают, что данный фермент в изученных образцах дуба черешчатого представлен мономорфной зоной и поэтому не может быть использован при проведении популяционно-генетических исследований.

3.1.7. Лейцинаминопептидаза

Лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1) – представитель группы пептидаз, гидролизующих концевые NH_2 -пептидные связи [18, 153, 164]. Этот фермент получил широкое распространение в природе как популяционно-генетический маркер. Фермент действует в первую очередь на пептиды, у которых аминокислота на N-конце имеет не замкнутую в кольцо боковую цепь. В качестве N-концевого звена в данном случае допускаются остатки не только лейцина, но и других аминокислот – гистидина, тирозина, триптофана и фенилаланина. Свою активность фермент проявляет в присутствии ионов цинка.

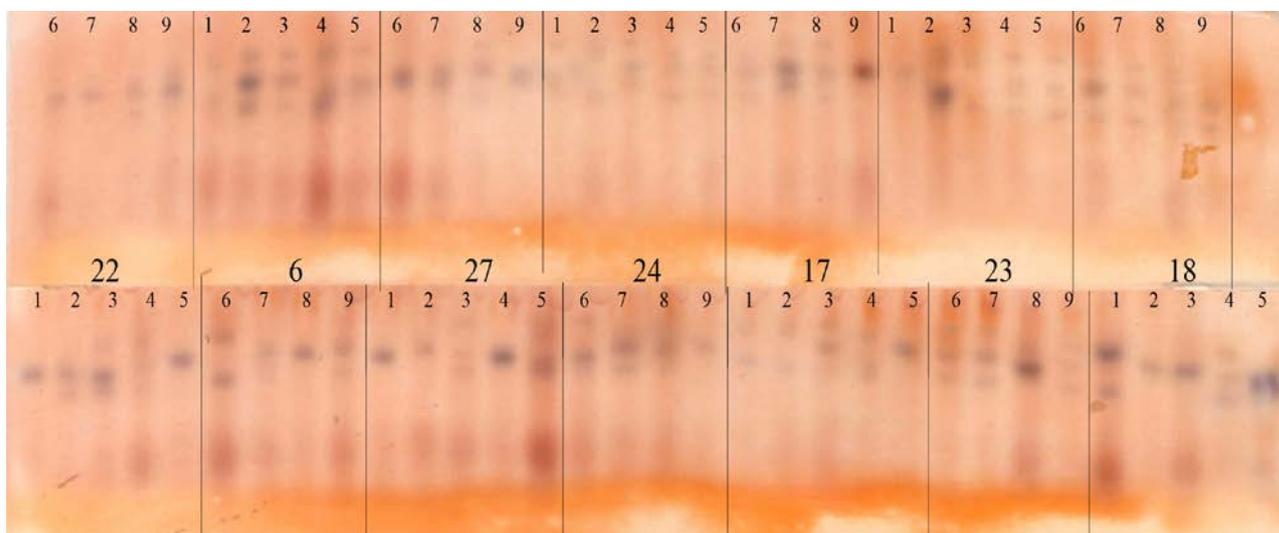
В белковом спектре данного фермента было выявлено большое количество различных вариантов. Установлено, что лейцинаминопептидаза у дуба черешчатого характеризуется наличием одного локуса Lap [74] (рис. 16, 17).



48, 13, 19, 20, 12, 21, 15 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 10 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 16 – Электрофореграмма белкового спектра лейцинаминопептидазы



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.

1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 17 – Электрофореграмма белкового спектра лейцинаминопептидазы

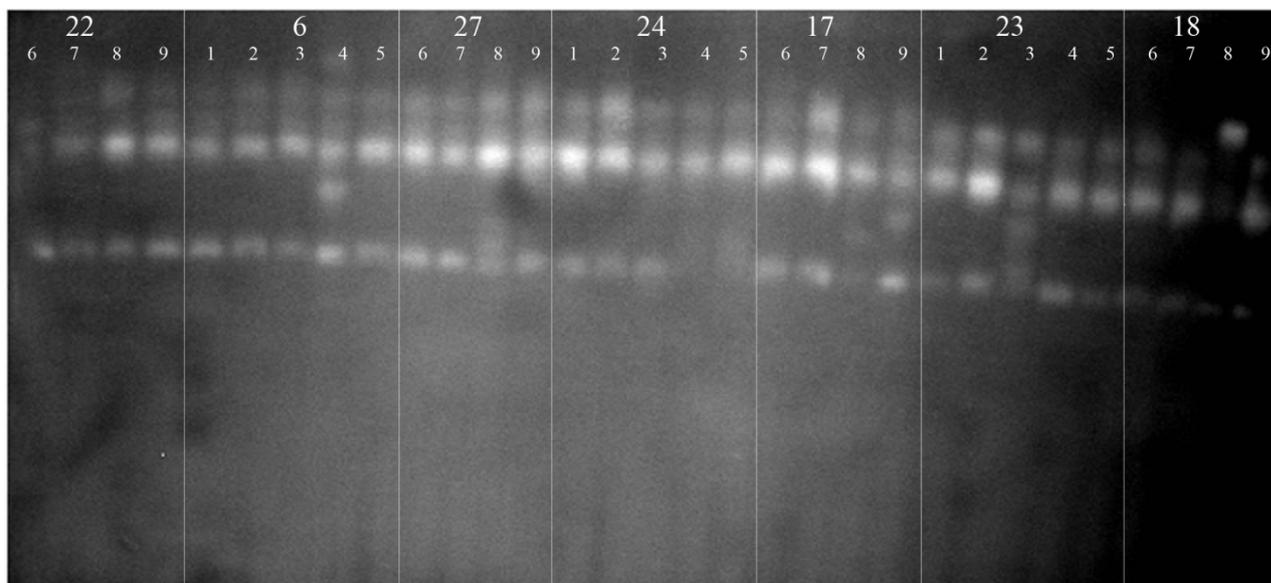
В исследованной группе образцов локус *Lar* проявляется на геле в виде трех белковых зон с R_f 1,00 и 1,05 и 1,10. Было выявлено много разных аллельных вариантов. Так, например, весьма часто встречалась комбинация 1,00/1,05 в климатипах 48 (Республика Чувашия) и 24 (Республика Башкортостан), на их долю приходится 44,7%. Так же частым было сочетание белковых зон с R_f 1,00/1,10, наибольшее их число было выявлено в образцах из Республики Татарстан, там на них приходится 67%. Мономорфные варианты представлены большим числом, их количество находится в пределах от 10% до 66%. Наибольшее количество мономорфных зон характерно для образцов из Самарской области (66%).

В общем, белковый спектр лейцинаминопептидазы в исследованной группе образцов дуба черешчатого обусловлен наличием большого количества альтернативных вариантов сочетаний аллелей, что характеризует данный фермент как весьма хороший маркер для проведения анализа по выявлению экотипов внутри популяции.

3.1.8. Флюоресцентная эстераза

Эстеразы – важная группа ферментов, участвующая в адаптационных процессах растений. Термином «эстераза», или «неспецифическая эстераза» обозначают ферменты, относящиеся к классу гидролаз и способные гидролизовать простые эфиры *N*-свободных спиртов и органических кислот (сложноэфирные связи) на спирты и кислоты при участии молекул воды (реакция гидролиза). К эстеразам относятся: фосфатазы, липазы, собственно эстеразы. К эстеразам принадлежат многочисленные специфические ферменты: хлорофиллаза, холинэстераза, пектаза, танназа и др. Эстеразы обнаружены у большинства живых организмов: человека, животных, высших растений и микроорганизмов [18].

Флюоресцентная эстераза (FE, КФ 3.1.1.2) катализирует реакции гидролиза сложноэфирных связей [18]. В своём белковом спектре она характеризуется наличием двух локусов: Fe-1 и Fe-2 [74] (рис. 18).



22, 6, 27, 24, 17, 23, 18 – номера плантаций дуба черешчатого по Госреестру.
1, 2, 3, ..., 9 – порядковый номер исследуемого дерева.

Рис. 18 – Электрофореграмма белкового спектра флюоресцентной эстеразы
(верхний старт)

В исследованной группе образцов локус Fe-1 проявляется на геле в виде двух белковых зон с Rf 1,00 и 0,90, а локус Fe-2 в виде трех белковых зон с Rf 1,30, 1,20 и 1,00.

Анализ белковых зон по климатипам выявил следующую зависимость в структуре спектра: по локусу Fe-1 наблюдалось преобладание мономорфных вариантов (1,00) от 100% до 67%. В остальных случаях наблюдалось сочетание 1,00/0,90. Локус Fe-2 так же характеризуется большим количеством мономорфных аллелей 1,00. Сочетание вариантов 1,00/1,20 было выявлено в 9% от общего числа образцов, а сочетание 1,00/1,30 обнаружено одно – климатип 17 (Курская область) образец №7.

Проанализировав полученные данные по полиморфизму белкового спектра ключевых ферментов основных метаболических путей клетки, можно заключить, что из 8 исследованных ферментов для проведения популяционно-генетического анализа наиболее подходящими 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 они 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, это связано с выполняемой функцией данных ферментов, участвующих в процессе адаптации к условиям среды обитания.

Полученные данные по всем образцам из 14 климатипов представлены в матричной таблице генотипов деревьев дуба черешчатого по 12 изоферментным локусам (приложение 2) для дальнейшей математической обработки с помощью программного обеспечения.

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

Для получения образцов ДНК без примесей и признаков деградации, используя в качестве основы стандартную методику выделения ДНК ЦТАБ-методом [122], были изменены некоторые стадии выделения и подобраны оптимальные временные, температурные и концентрационные условия, что дало возможность получить образец ДНК с отсутствием деградации и примесей, что было подтверждено спектрофотометрически и электрофореграммой полученных препаратов (рис.19).

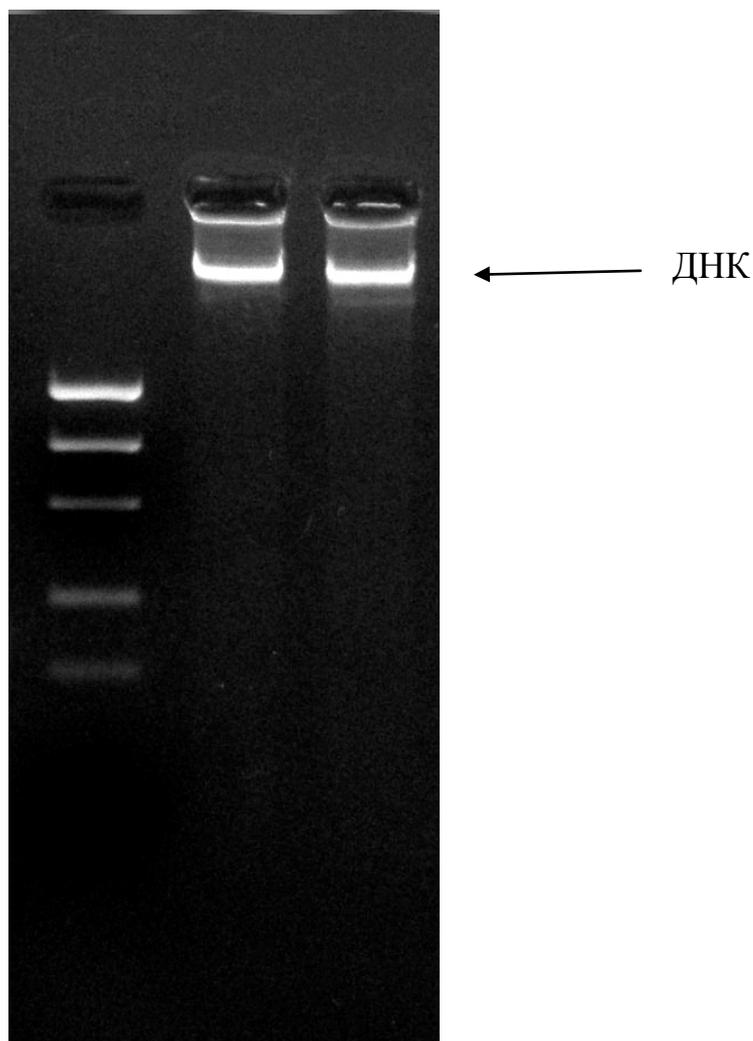


Рис. 19– Электрофоретический спектр недеградированных препаратов ДНК из дуба черешчатого

Концентрация полученных препаратов ДНК из дуба черешчатого в среднем составила от 0,5 до 0,9 нг. Полученные образцы имели соотношение поглощения при 260 нм/280 нм равное, в среднем, 1,85, что подтверждает, что полученные образцы ДНК являются чистыми.

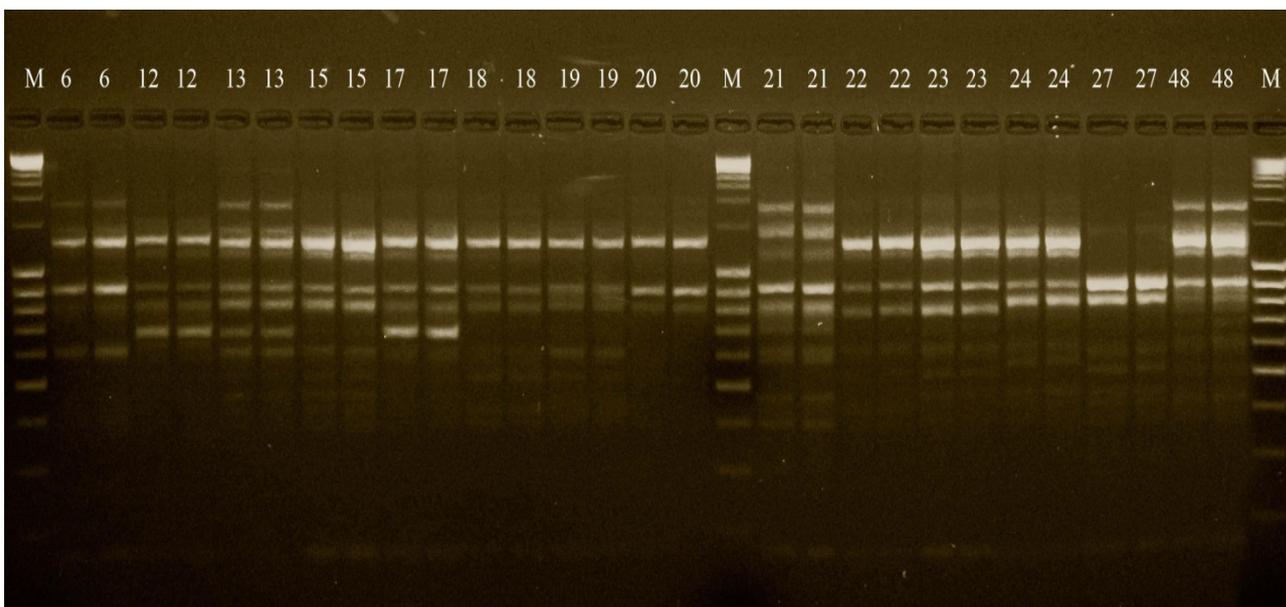
Затем проводили ПЦР-анализ, где в качестве затравки использовались следующие RAPD-праймеры: Oligo 16, Oligo 29, Oligo 4, Oligo 6 (таблица 3), выделенные как наиболее информативные при популяционном анализе у дуба черешчатого [160].

Таблица 3 – Праймеры, используемые для популяционного анализа дуба черешчатого

Название	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига (Ta)
Oligo 16	GCCCCTCGTC	48 °C
Oligo 29	CCGGCCTTAC	48 °C
Oligo 4	CAAACGGCAC	48 °C
Oligo 6	CCTGGGCCTA	48 °C

Реакцию амплификации проводили в термоциклире фирмы «Терцик» (Россия) в течение 2,5 ч. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации осуществляли в 2% агарозном геле с 1X TAE-буфером при 120 Вт в течение 40 мин. Готовый гель окрашивали бромистым этидием, полученные фрагменты ДНК анализировали в трансиллюминаторе «Vilber Lourmat» (Франция).

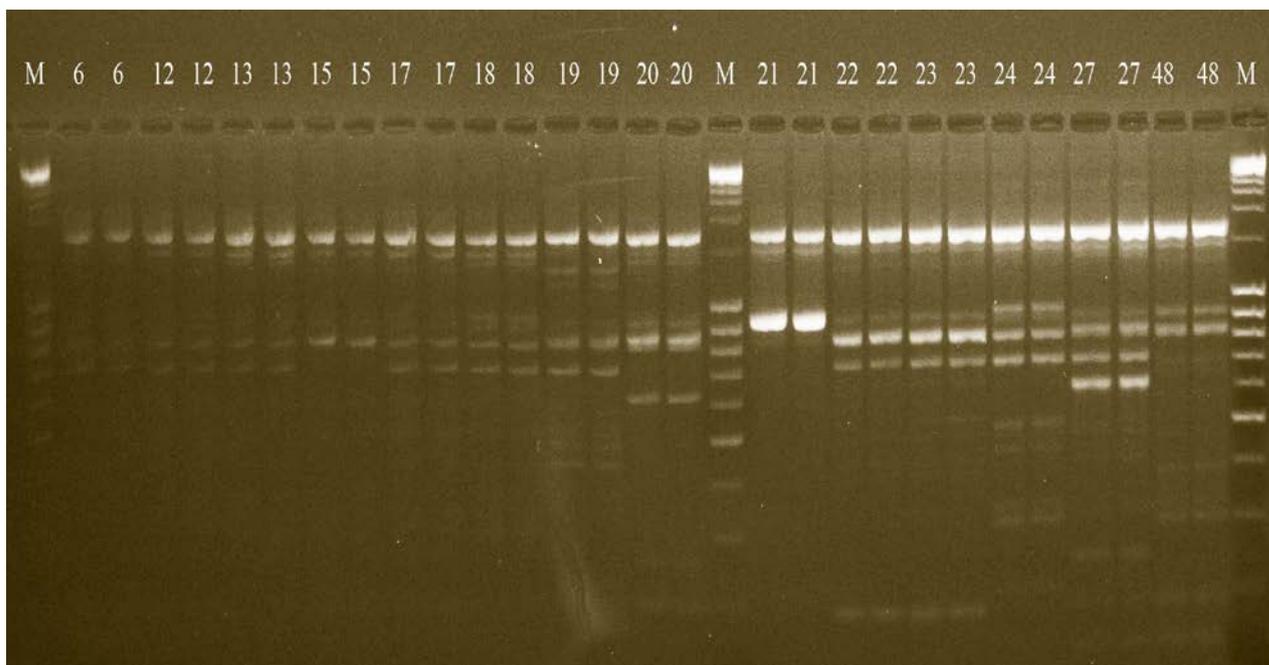
Подобрав оптимальные условия для ПЦР, был проведён анализ каждого климатипа дуба черешчатого с использованием 4 RADP-праймеров (рис. 20–23).



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

Рис. 20 – Электрофореграмма ПЦР деревьев дуба черешчатого с использованием RAPD-праймера Oligo 29

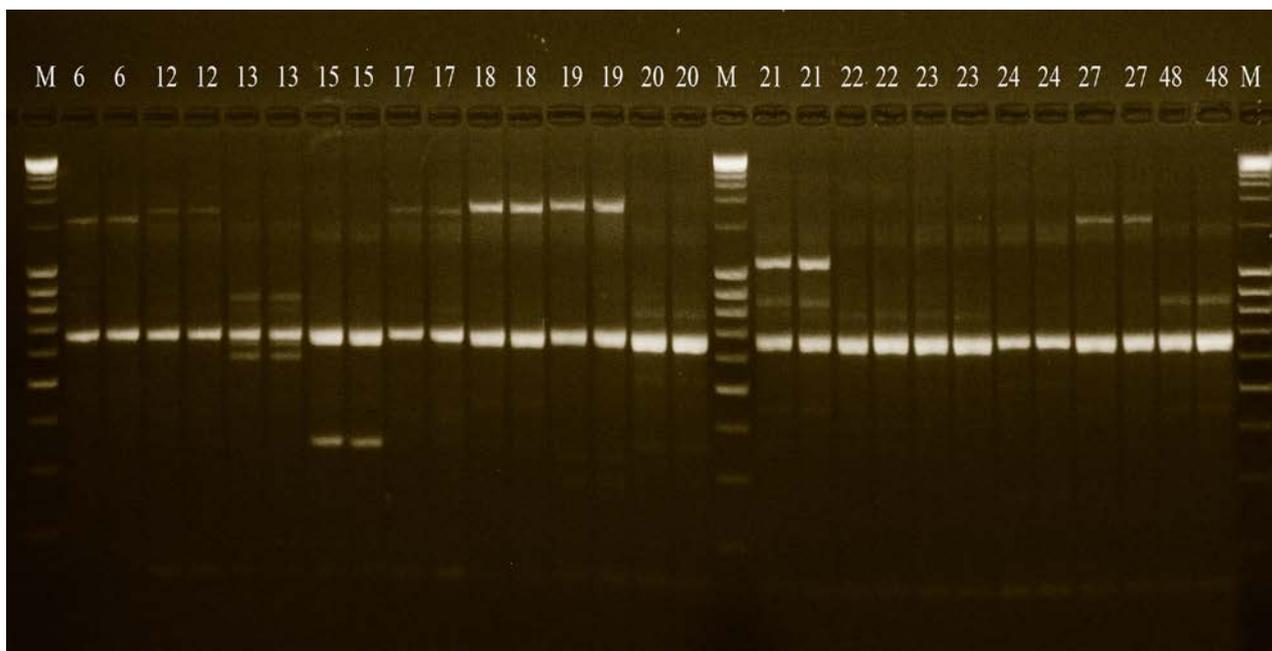
На электрофореграмме продуктов амплификации инвертированных участков ДНК дуба черешчатого с использованием праймера Oligo 29 выявлена следующая зависимость: число амплифицированных фрагментов по данному праймеру равнялось 7, а их длина составила от 600 пн до 1950 пн. Из семи фрагментов три оказались характерны для всех климатипов (900, 800 и 600 пн). В остальных случаях наблюдалось проявление полиморфизма в структуре ДНК.



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

Рис. 21 – Электрофореграмма ПЦР деревьев дуба черешчатого с использованием RAPD-праймера Oligo 6

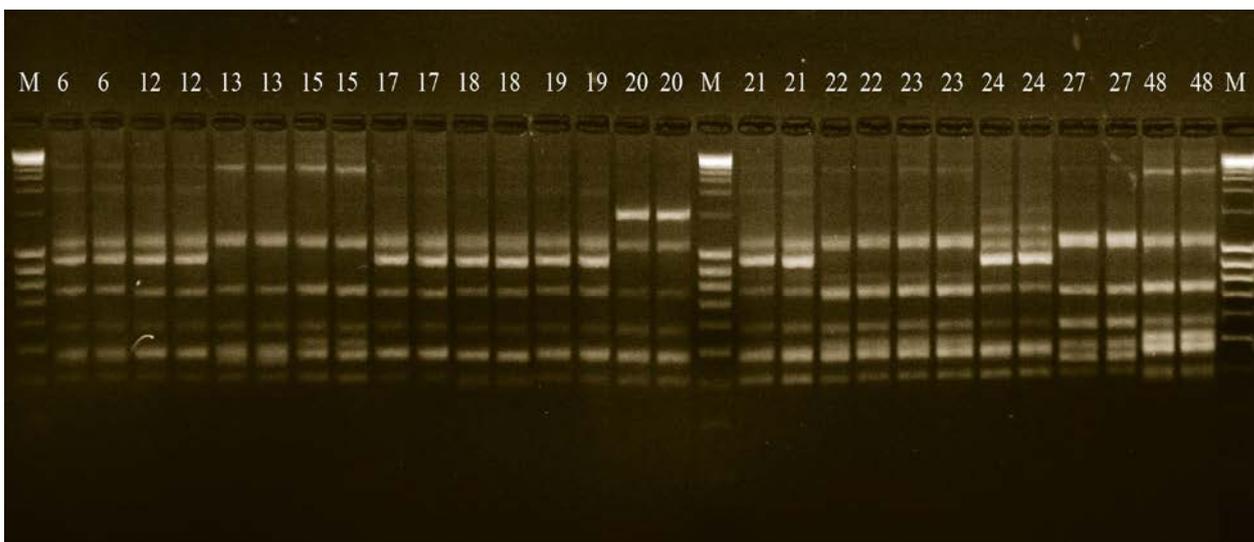
Число амплифицированных фрагментов ПЦР, когда в качестве затравки использовали RAPD-праймер Oligo 6 равнялось пяти. Два ампликона (1600 пн и 900 пн) были характерны для всех исследованных климатипов дуба черешчатого.



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

Рис. 22 – Электрофореграмма ПЦР деревьев дуба черешчатого с использованием RAPD-праймера Oligo 4

В реакции амплификации с использованием RAPD-праймера Oligo 4 на электрофореграмме наблюдалось проявление шести фрагментов. Их размеры варьировали от 1700 пн до 380 пн. Среди ампликонов наблюдался (700 пн) один, характерный для всех климатипов дуба черешчатого. В остальных случаях наблюдался полиморфизм в спектре ампликонов.



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

Рис. 23 – Электрофореграмма ПЦР деревьев дуба черешчатого с использованием RAPD-праймера Oligo 16

На электрофореграмме продуктов ПЦР, где в качестве затравки использовали RAPD-праймер Oligo 16 наблюдалось проявление 8 фрагментов (от 3000 пн до 500 пн). Характерными для всех представленных климатипов дуба черешчатого оказались 4 ампликона (1200 пн, 750 пн, 600 пн и 500 пн)

Полученные электрофореграммы спектров ампликонов при RAPD-анализе у дуба черешчатого послужили основой для составления усреднённых таблиц, отражающих наличие или отсутствие соответствующего ампликона у групп образцов разных мест происхождения, характерного для каждого из праймеров, с целью дальнейшего обсчета с помощью программного обеспечения POPGENE.

3.3. Полиморфизм ДНК-маркеров дуба колоновидного

В ходе исследования по выявлению полиморфизма молекулярных маркеров у древесных растений была проведена аналогичная работа, но в качестве объекта использовали дуб черешчатый колоновидной формы кроны.

Разные авторы используют различные латинские названия: *Quercus robur Fastigiata* или *Q. Robur var. pyramidalis*. Есть несколько предположений о происхождении этой формы дуба. Одна из них заключается в том, что конусообразный дуб был первоначально размножен от дерева, найденного в Центральной Европе, а оттуда занесен и в нашу страну, в частности, в Воронежскую область [88]. Колоновидный дуб отличается не только формой кроны, но и большей энергией роста. В равных условиях произрастания дуб черешчатый колоновидной формы растет более интенсивно, чем обыкновенный.

Дуб черешчатый колоновидный, по мнению ряда авторов, является самопроизвольным гибридом. Поэтому при размножении с помощью желудей у потомства пирамидального дуба наблюдается расщепление по форме кроны.

Объектами исследования полиморфизма ДНК-маркеров у деревьев дуба колоновидного были: а) клонового происхождения, произрастающие в городе Воронеже (прививки 1963 года) (рис.24) и Семилукском питомнике (прививки 1978 года); б) семенного происхождения с двух делянок и краевых рядов из Семилукского питомника в возрасте 13 лет; в) образцы дуба колоновидного из г. Волгограда.

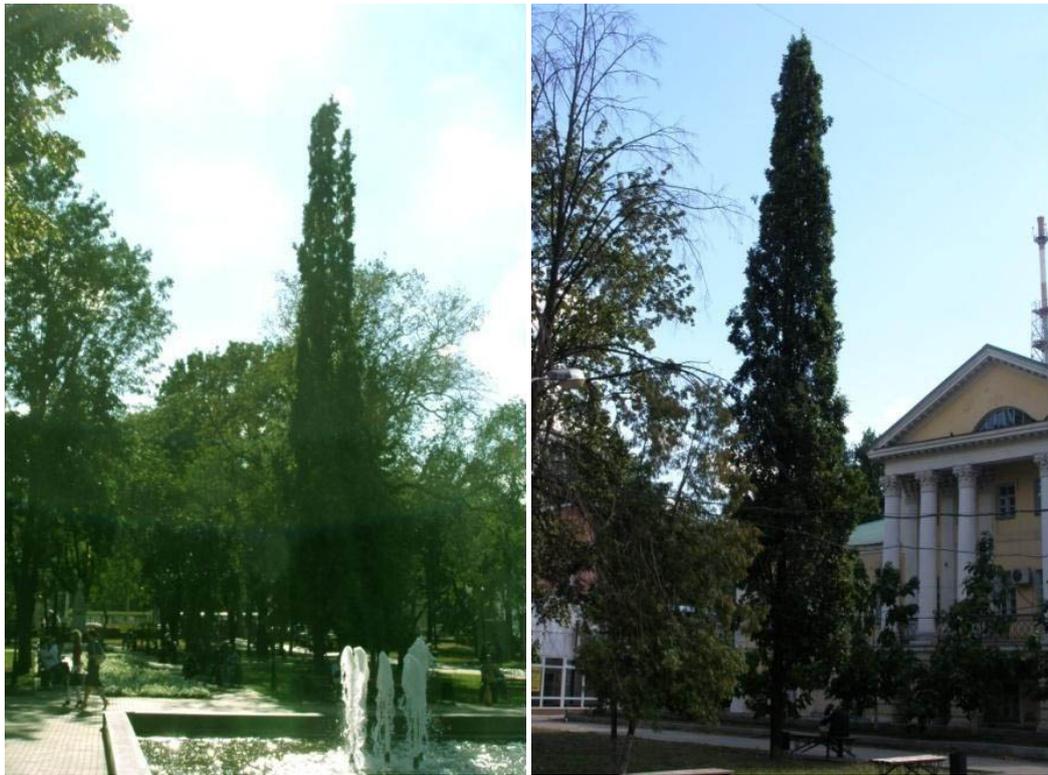


Рис. 24 – Дуб черешчатый колоновидной формы кроны клонового происхождения города Воронежа

Анализ изменчивости спектра инвертированных повторов ДНК дуба черешчатого колоновидной формы кроны проводили с использованием 9

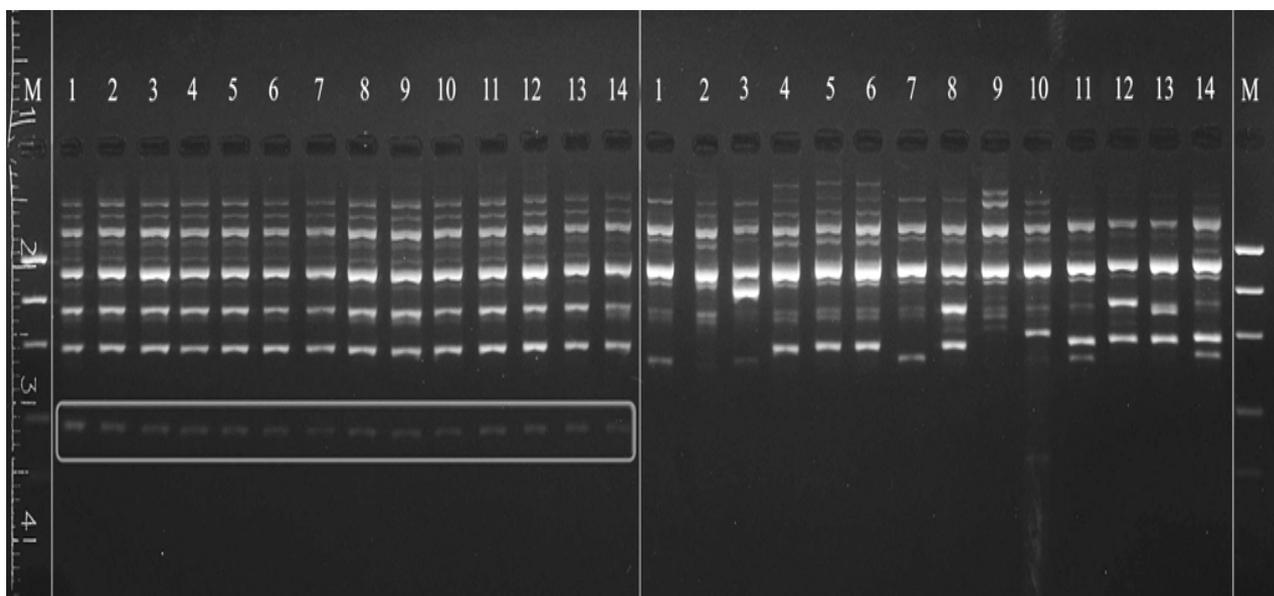
RAPD-праймеров (Oligo 1, Oligo 2, Oligo 3, Oligo 4, Oligo 5, Oligo 6, Oligo 12, Oligo 19, Oligo 29) (таблица 4) (приложение 3, рис.1 П-16 П).

Таблица 4 – Праймеры, используемые для анализа дуба черешчатого колоновидной формы кроны

Название	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига (Т _a)
Oligo 1	CCTGGGCTTC	48 °C
Oligo 2	CCTGGGCTTG	48 °C
Oligo 3	CCTGGGCTTA	48 °C
Oligo 4	CAAACGGCAC	48 °C
Oligo 5	CCTGGGTTCC	48 °C
Oligo 6	CCTGGGCCTA	48 °C
Oligo 12	CCTGGGTCCA	48 °C
Oligo 19	GCCGGGTTTA	48 °C
Oligo 29	CCGGCCTTAC	54 °C

При проведении детального анализа спектров ампликонов по каждому из праймеров для каждой группы дубов была показана высокая степень вариабельности спектра ампликонов внутри каждой выборки. Оказалось, что один праймер (Oligo 5) показывал явные и четкие отличия между образцами из г. Воронежа и г. Волгограда. В случае ПЦР образцов дуба с колоновидной формой кроны из г. Воронежа сданным праймером наблюдалась полоса на электрофореграмме в области 300 пн. Если в качестве матрицы использовалась ДНК из дуба из Волгоградской области, данная полоса отсутствовала (рис.25). Получается, что популяции дуба черешчатого колоновидной формы из г. Воронежа и г. Волгограда имеют весьма большие различия в спектре

молекулярных маркеров, что возможно ассоциировано с разным климатом в исследуемых областях.



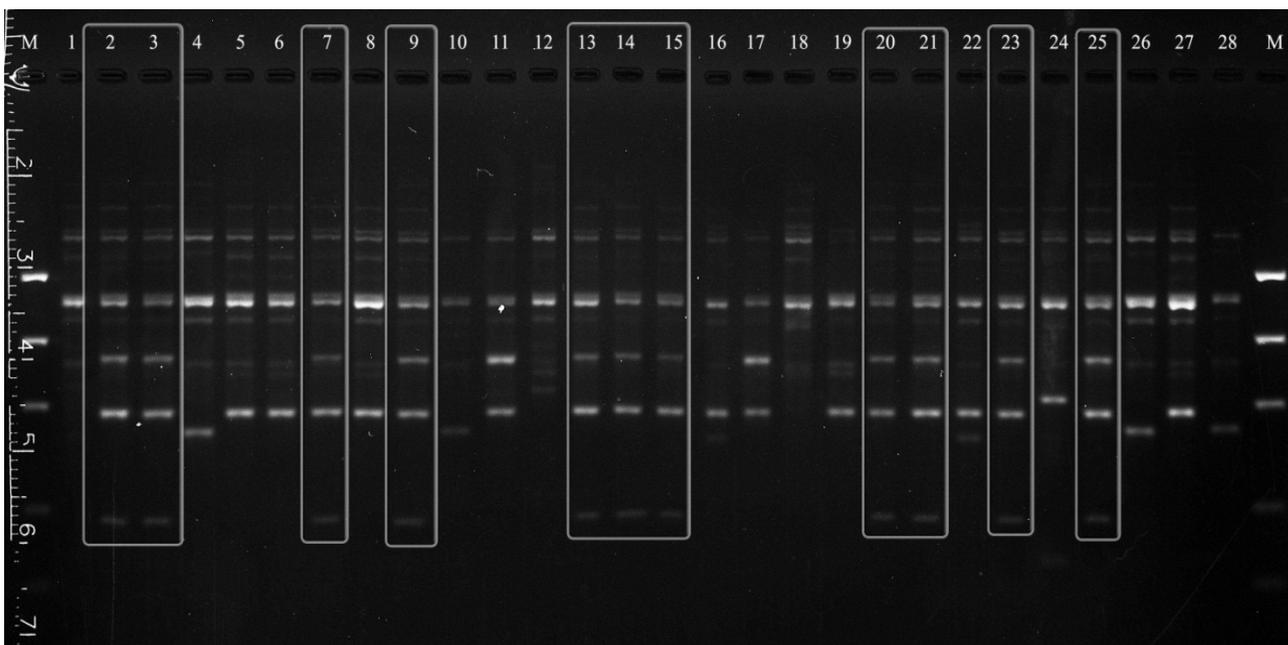
М – маркеры молекулярных масс (100, 300, 500, 700, 800,1000 пн);

1–14 – номер образца

Рис. 25 – 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. Это является весьма значимым показателем, поскольку, как известно, у потомства пирамидального дуба при семенном размножении наблюдается расщепление по форме кроны. По одним литературным данным процент расщепления находится в пределах 30 – 70% [81], по другим – лежит в районе 50% [46]. Особого внимания заслуживает и тот факт, что фенотипически разделение по форме кроны у семенного потомства дуба колоновидного проявляются только к 4–5 годам роста, а до этого момента они выглядят одинаково.

Получив результат, подтверждающий, что формоспецифичность у дуба черешчатого ассоциирована с наличием полосы в области 300 пн на электрофореграмме, была поставлена ПЦР с праймером Oligo 5, где в качестве матрицы применялась ДНК, выделенная из семян дуба черешчатого колоновидной формы в возрасте 4-х месяцев, когда ещё признак колоновидности не проявился, для диагностирования формоспецифичности проростков. Результат представлен на рис. 26.



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

1–28 – номер образца

В прямоугольник выделены предполагаемые кандидаты в деревья с колоновидной формой кроны.

Рис. 26 – Электрофореграмма продуктов ПЦР семян от дуба черешчатого формы пирамидальной в агарозном геле с использованием праймера Oligo 5

Из электрофореграммы видно, что 39,3% (11 из 28) образцов имеют ампликон в области 300 пн. Наличие данной полосы у исследуемых деревьев скорее всего является индикатором того, что в будущем они будут иметь колоновидную форму кроны.

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

Популяционно-генетический анализ древесных растений создает научную базу для теоретического обоснования и планирования селекционных работ по сохранению, улучшению и воспроизводству генетического потенциала видов в тех или иных регионах.

Материал образцов дуба черешчатого был проанализирован изоферментным методом и методом ДНК анализа. Анализируя полученные генотипы, следует отметить большое количество гомозигот по альтернативным аллелям и явный недостаток гетерозигот.

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 по 12 исследованным генам обнаружено 33 аллеля. Необходимо отметить, что в насаждениях дуба черешчатого других стран, например в Беларуси, в целом было выявлено 48 аллелей [38].

В ходе исследования рассчитаны частоты встречаемости всех выявленных аллельных вариантов, представленные в таблице 5.

Таблица 5 – Аллельные частоты по 12 локусам в исследованных образцах дуба черешчатого разных мест происхождения

Локус, аллель	48	23	6	19	13	15	18	24	20	12	22	27	17	21	В среднем
Fe-1															
0.90	0,111	0,056	0,056	0,111	0,056	0,056	0,056	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,056	0,167	0,059
1.00	0,889	0,944	0,944	0,889	0,944	0,944	0,944	1,000	1,000	1,000	0,889	1,000	0,944	0,833	0,941
Fe-2															
1.00	0,944	0,944	1,000	0,889	1,000	0,889	1,000	0,889	1,000	0,778	0,944	0,944	0,944	0,944	0,937
1.20	0,056	0,056	0,000	0,111	0,000	0,111	0,000	0,111	0,000	0,222	0,056	0,056	0,000	0,056	0,063
1.30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000
Pgm															
0.80	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,016
0.90	0,333	0,333	0,167	0,333	0,500	0,389	0,222	0,389	0,300	0,611	0,333	0,278	0,333	0,333	0,346
1.00	0,667	0,667	0,777	0,667	0,500	0,611	0,778	0,500	0,700	0,389	0,667	0,666	0,667	0,667	0,638
Gpi-1															
1.00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Gpi-2															
1.00	0,888	1,000	1,000	0,944	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	1,000	1,000	1,000	0,944	0,980
1.10	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008
1.15	0,056	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,012
Idh															
1.00	0,500	1,000	0,500	0,556	0,667	0,667	0,500	0,556	0,600	0,611	0,833	0,722	0,556	0,611	0,634
1.15	0,500	0,000	0,500	0,333	0,333	0,333	0,500	0,333	0,350	0,333	0,111	0,278	0,444	0,333	0,334
1.35	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000	0,111	0,050	0,056	0,056	0,000	0,000	0,056	0,032
Alap-1															
0.90	0,385	0,556	0,556	0,500	0,667	0,667	0,444	0,500	0,550	0,333	0,278	0,222	0,389	0,389	0,460
0.95	0,167	0,167	0,167	0,278	0,222	0,111	0,111	0,167	0,250	0,167	0,222	0,444	0,167	0,222	0,205
1.00	0,444	0,277	0,277	0,222	0,111	0,222	0,445	0,333	0,200	0,500	0,500	0,334	0,444	0,389	0,335

Продолжение таблицы 5

Локус, аллель	48	23	6	19	13	15	18	24	20	12	22	27	17	21	В среднем
Alap-2															
0.95	0,222	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,056	0,000	0,150	0,167	0,000	0,111	0,000	0,111	0,063
1.00	0,611	0,556	0,611	0,444	0,611	0,556	0,721	0,667	0,450	0,777	0,833	0,611	0,389	0,667	0,606
1.05	0,167	0,444	0,333	0,500	0,333	0,444	0,167	0,333	0,400	0,056	0,167	0,278	0,611	0,222	0,319
1.15	0,000	0,000	0,056	0,000	0,056	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012
Lap															
1.00	0,554	0,445	0,444	0,554	0,222	0,222	0,611	0,500	0,450	0,500	0,667	0,777	0,444	0,445	0,488
1.05	0,278	0,222	0,167	0,056	0,278	0,222	0,167	0,278	0,200	0,333	0,222	0,056	0,278	0,222	0,213
1.10	0,167	0,333	0,389	0,386	0,500	0,556	0,222	0,222	0,350	0,167	0,111	0,167	0,278	0,333	0,299
Adh-1															
0.85	0,389	0,222	0,333	0,167	0,287	0,500	0,167	0,333	0,050	0,381	0,222	0,111	0,222	0,333	0,264
1.00	0,611	0,778	0,667	0,833	0,722	0,500	0,833	0,667	0,950	0,611	0,778	0,889	0,778	0,667	0,736
Adh-2															
0.90	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,012
1.00	0,944	0,889	0,944	0,889	0,833	0,889	0,889	0,888	0,950	0,889	0,777	1,000	0,944	0,944	0,905
1.15	0,056	0,111	0,000	0,111	0,167	0,111	0,111	0,056	0,050	0,111	0,167	0,000	0,056	0,056	0,083
Skdh															
0.90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,056	0,000	0,008
1.00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	0,944	1,000	1,000	0,944	1,000	1,000	0,944	1,000	0,984
1.10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008

Примечание: 48, 23, 6, 19, 13, 15, 18, 24, 20, 12, 22, 27, 17, 21- номер плантации по Госреестру

Установлено, что в большинстве экотипов 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}, Alar-1^{0.90} и Alar-2^{1.05}. Выявлено, что наиболее изменчивыми локусами являются: Alar-1, Alar-2, Lar и Pgm, ожидаемая гетерозиготность по которым составила более 34%. Мономорфным во всех исследованных насаждениях был только один из 12 генов – Gri-1. В исследованных культурах были обнаружены практически все нередкие аллели (т.е. аллели в частотой более 1%), выявленные ранее в насаждениях дуба черешчатого в Беларуси, России и Европе [38, 83, 180].

Для того чтобы более точно оценить уровень генетической изменчивости для каждого из исследованных климатипов дуба черешчатого, были рассчитаны основные параметры генетического полиморфизма (таблица 6).

Таблица 6 – Параметры генетической изменчивости исследованных климатипов дуба черешчатого

Местонахождение: республика, область, лесхоз	Доля поли- морфных ло- кусов(P)	Число аллелей на локус (A)	Средняя гетерозиготность	
			ожидаемая (H _e)	наблюдаемая (H _o)
Россия, Чувашия, По- рецкий	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

Продолжение таблицы 6

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, На- влинский	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, Ко- вылкинский	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, Золо- тухинский	0,833	2,000±0,603	0,288±0,037	0,111±0,030
Россия, Марий Эл, Ку- ярский	0,833	2,167±0,718	0,315±0,039	0,139±0,032
Среднее	0,750	2,667±0,778	0,301±0,010	0,135±0,008

Как следует из таблицы 6, 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 кли-

матипов 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%, составляя в среднем 30,1%. Наиболее высокий уровень ожидаемой гетерозиготности (более 31%) установлен для климатипов из Респ. Чувашия, Воронежской 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%. Можно было бы предположить, что данная особенность характерна для искусственных насаждений дуба черешчатого. Однако, при проведении генетического анализа лесосеменных плантаций дуба [152, 168, 178], такой закономерности выявлено не было. По-видимому, выявленное значительное смещение значений H_o относительно величин H_e связано с так называемым «эффектом основателя». Иными словами, для закладки исследованных географических культур дуба черешчатого, кроме климатипа 48, были использованы желуди от очень ограниченного количества рядом произрастающих деревьев.

Сравнение установленного на основе молекулярно-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 7) (исключение – параметр наблюдаемой гетерозиготности).

Так, выявленная доля полиморфных локусов (P_{95}) у деревьев дуба черешчатого составляет 75,0%, что в целом соответствует средним значениям данного параметра в дубравах Центральной и Западной Европы. Количество аллелей на локус в насаждениях дуба черешчатого ($A = 2,667$) Воронежской области не-

сколькo 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 ($0,188$) [38].

Таблица 7 – Сравнительная характеристика генетических параметров насаждений дуба черешчатого в Беларуси, России и странах Центральной и Западной Европы на основе изоферментного анализа

Страна	P_{95}	A	H_e	H_o	Литературный источник
Франция, Германия	–	2,900	0,250	0,213–0,267	[22, 47]
Германия	–	–	0,247–0,321	0,217–0,259	[48]
Италия	0,854	2,600	0,236 (0,214–0,253)	0,214 (0,192–0,225)	[19]
Швейцария	–	2,700	0,241	0,222	[49]
Финляндия	0,308–0,615	2,100	0,188	0,155	[50]
Европа	0,700	2,700 (2,500–2,900)	0,252 (0,238–0,266)	0,184 (0,166–0,202)	[46]
Марий Эл (Россия)	0,583–0,667	2,500 (2,400–2,500)	0,162–0,184	0,170 (0,161–0,178)	[45]
Белорусское Полесье	0,615 (0,538–0,692)	2,500 (2,200–2,400)	0,237 (0,217–0,243)	0,227 (0,215–0,251)	[44]
Российская Федерация (европейская часть лесостепи)	0,750 (0,583-0,833)	2,667 (1,833-2,167)	0,301 (0,227-0,318)	0,135 (0,093-0,269)	Наши данные

Примечание: P_{95} – доля полиморфных локусов; A – число аллелей на локус; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность

3.5. Структура популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации

На основании коэффициентов генетической дистанции Неи была установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными географическими культурами дуба черешчатого. Найденные значения коэффициентов генетической дистанции (D_N) представлены в таблице 8.

Таблица 8 – 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

Значения D_N варьируют от 0,008 до 0,071, в среднем составляя 0,029.

В таблице 9 приведены 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}), рассчитанные различными способами по 12 исследованным локусам дуба черешчатого.

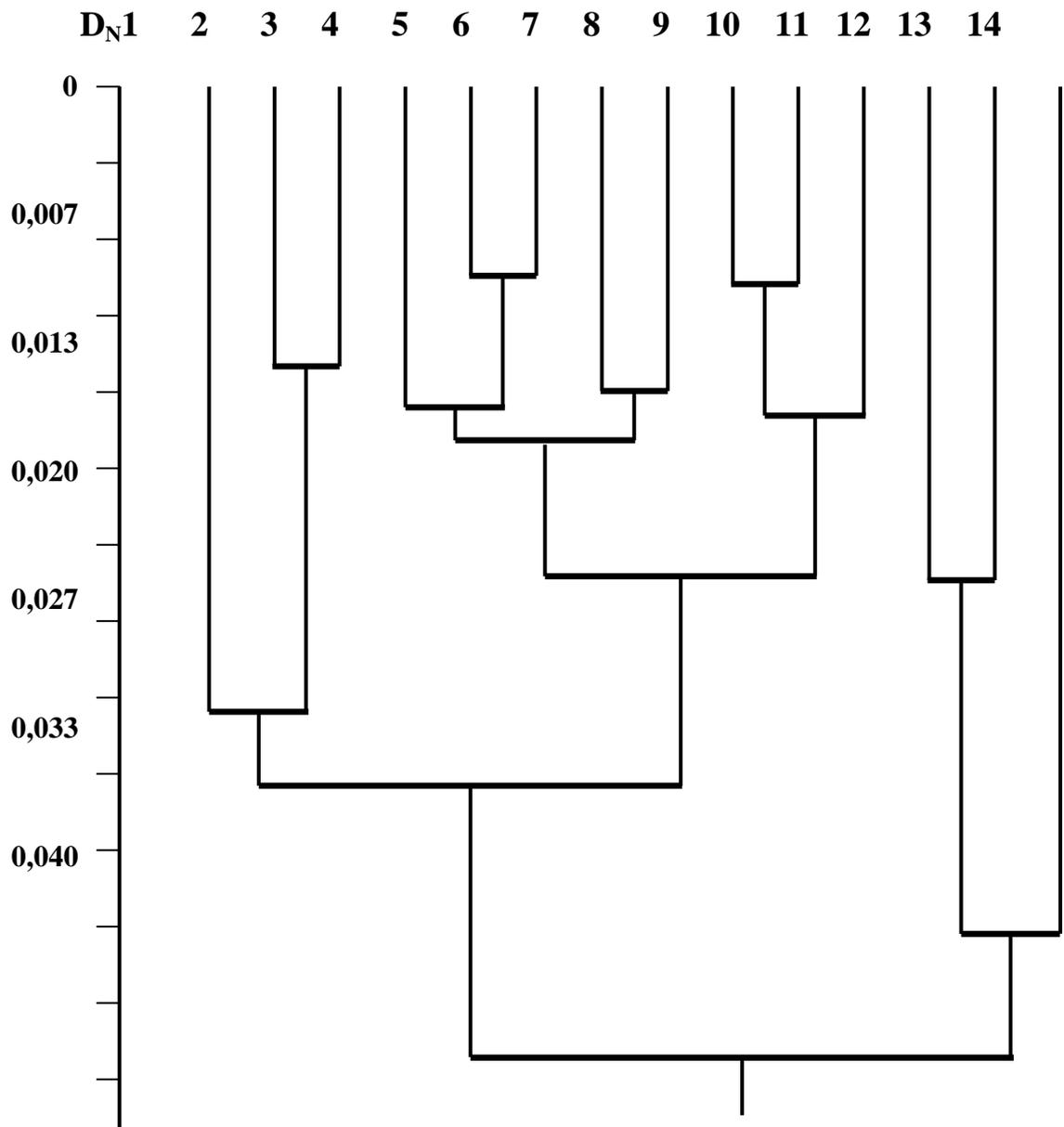
Таблица 9 – Значения F- и G-статистик по 12 локусам дуба черешчатого из лесостепи европейской части Российской Федерации

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
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 9 следует, что величины F_{IS} находятся в пределах от -0,017 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. 27).



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

Рис. 27 – Дендрограмма исследованных климатипов дуба черешчатого

Исходя из структуры дендрограммы, прослеживается некоторая особенность в кластеризации исследованных географических культур дуба черешчатого. Первый кластер составляют три насаждения под номерами 1, 2, 3. Вторым кластером с достаточно близкими генетическими структурами образуют восемь из

14 исследованных климатипов. Третий кластер составили климатипы под номерами 12, 13, 14 (рис. 28). В целом, такое объединение исследованных климатипов соответствует географическому расположению материнских насаждений, за исключением насаждений из первого кластера.

Полученные данные генетической структуры дуба черешчатого послужили основой для проведения количественной оценки степени генетических различий между насаждениями и расчета значения коэффициентов D_N с использованием невзвешенного парно-группового анализа (UPGMA), и была построена дендрограмма для исследованных климатипов дуба черешчатого, что позволило определить границы экотипов дуба из разных мест происхождения (рис. 29).

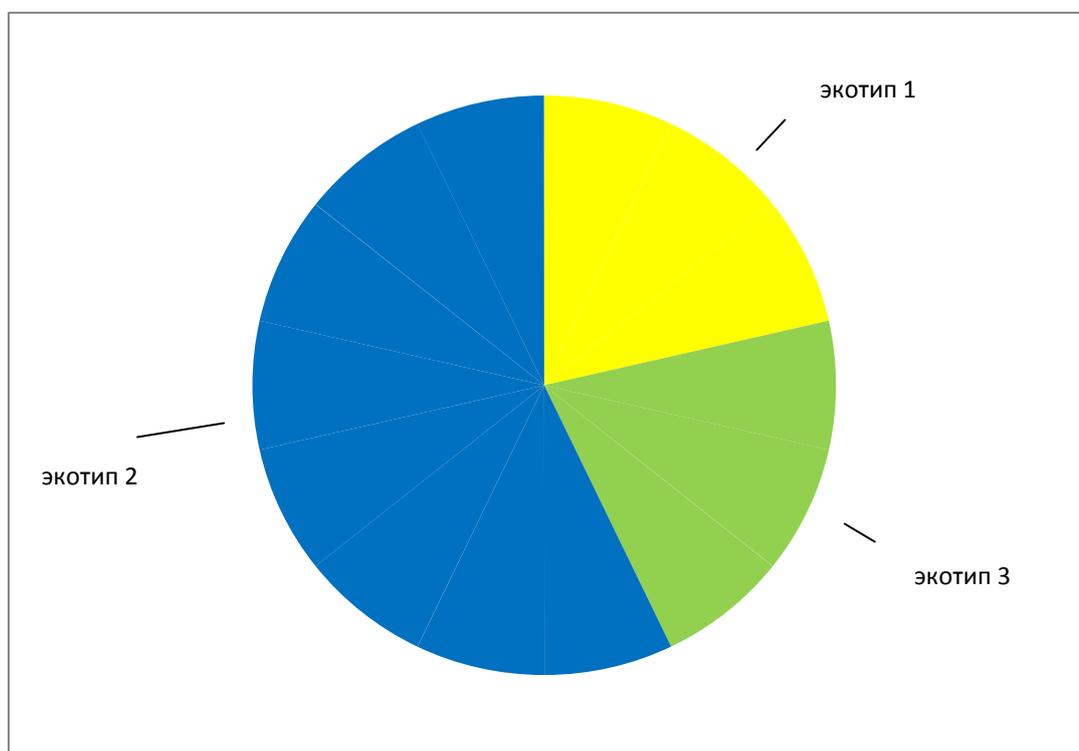
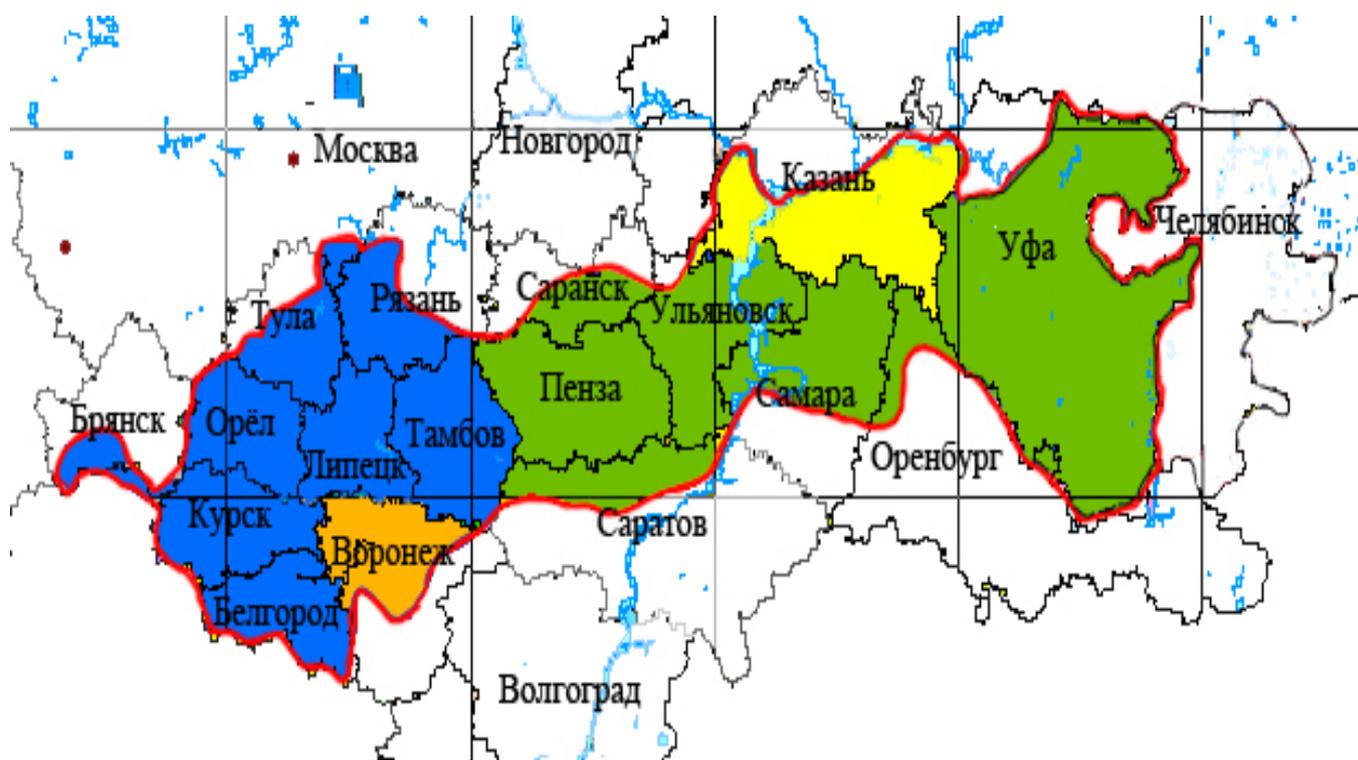


Рис. 28 – Популяционная структура дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации



- - экотип № 1
- - экотип № 2
- - экотип № 3
- - экотип № 1,2

Рис. 29 – Карта границ популяционной структуры дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение изменения биохимических показателей 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). Скорее всего, это связано с выполняемой функцией данных ферментов, участвующих в процессе адаптации дуба черешчатого к условиям среды обитания.

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-праймерами 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. Такое явление могло иметь место в случае, когда на протекание адаптационных 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. Это возможно, поскольку данные растения по образу и условиям произрастания, по морфологическим признакам, по особенностям биохимического обмена подходят под дуб черешчатый, 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. В ходе исследований с использованием 8 ген-ферментных систем, кодирующихся 12 локусами, был проведен биохимико-генетический анализ 14 климатипов дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации. Показано, что из 8 исследованных ферментов для проведения популяционно-генетического анализа наиболее подходящими являются 6: алкогольдегидрогеназа, аланинаминопептидаза, изоцитратдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, лейцинаминопептидаза, флюоресцентная эстераза.

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 ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 2003. – 431 с.
2. Алтухов Ю. П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 3. № 9. – С.1173–1195.
3. Антонова О. Ю. Генетическая дифференциация сортов картофеля с использованием SSR-маркеров / О. Ю. Антонова [и др.] // Аграрная Россия. – 2004. – №6. – С. 19–24.
4. Артюкова Е. В. RAPD- и аллозимный анализ генетической изменчивости *Panax ginseng* C. A. Meyer и *P. quinquefolius* L. / Е. В. Артюкова [и др.] // Генетика. – 2004. – Т. 40. №2. – С. 239–247.
5. Баранов О. Ю. Использование RFLP-метода для анализа ДНК березы повислой / О. Ю. Баранов [и др.] // Проблемы лесоведения и лесоводства. – 2005. – Вып.64. – С.163–171.
6. Белоконь Ю. С. Генетический контроль изоферментов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из Зауралья / Ю. С. Белоконь, Д. В. Политов, М. М. Белоконь, К. В. Крутовский // Генетика. – 1995. – т. 31, №11. – С. 1521–1528.
7. Бельтюкова Н. Н. Исследование генетического полиморфизма лекарственного вида *Digitalis grandiflora* Mill, с использованием анализа ретротранспозонов / Н. Н. Бельтюкова, С. В. Боронникова, Л. Г. Кариева // Аграрная Россия. – 2009. – №4. – С. 20–23.
8. Блажей А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый. – М. : Мир, 1977. – 260с.
9. Богаченко Л. П. Солеустойчивость дуба черешчатого и вяза перистоветвистого на почвах светло-каштановой подзоны: Автореф. дис.... канд. с.-х. наук. : М., 1965. – 17 с.
10. Боронникова С. В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой уничтожения видов растений. – Пермь: Перм. ун-т, 2008. – 120 с.

11. Боронникова С. В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов / С. В. Боронникова // Аграрный вестник Урала. – 2009. – №2 (56). – С. 57–59.
12. Булат С. А. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов / С. А. Булат, О. К. Кабоев, Н. В. Мироненко // Генетика. – 1992. – Т. 28. – С. 19–28.
13. Быков О. Д. Модель влияния фотосинтеза на дыхание листьев высших растений / О. Д. Быков // Физиология растений. – 1985. – Т.32. №3. – С. 421–430.
14. Вехов А. А. Биологические и экологические особенности дуба черешчатого / А. А. Вехов // Культуры дуба. – 1954. – С. 5–36.
15. Воскресенская Н. П. Фоторегуляторные аспекты метаболизма растений / Н. П. Воскресенская // 38-е Тимирязевские чтения – 1979. – С. 47–51.
16. Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома / В. А. Гвоздев // Соросовский образоват. журн. – 1998. – № 8. – С. 15–21.
17. Геращенко Г. А. RAPD-ПЦР-анализ изменчивости генома сортов яровой мягкой пшеницы и их андроклинных дигиплоидных форм / Г. А. Геращенко [и др.] // Генетика. – 2000. – Т. 36. – С. 1081–1087.
18. Глазго В. И. Генетика изоферментов животных и растений / В. И. Глазго, И. А. Созинов. – Киев: Урожай, 1993. – 528 с.
19. Глиоксилатный цикл растений / А. А. Землянухин [и др.]. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1986. – 148 с.
20. Голик К. Н. Темновое дыхание растений / К. Н. Голик. – Киев: Наукова думка, 1990. – 136 с.
21. Головки Т. К. Дыхание растений (физиологические аспекты) / Т. К. Головки. – СПб.: Наука, 1999. – 204 с.

22. Гончаренко Г. Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падуров, В. В. Потенко. – Гомель: Полеспечать, 1989. – 164 с.
23. Гроздова Н. Б. Занимательная дендрология / Н. Б. Гроздова. – М.: Лесная промышленность, 1991. – 208 с.
24. Громцев А. Н. Ландшафтный подход к оценке биоразнообразия / А. Н. Громцев // Биологическое разнообразие лесных экосистем (Матер. Всерос. Совещ. в Москве, ноябрь 1995) – М., 1995. – С. 16–19.
25. Гурский А. В. Основные итоги интродукции древесных растений в СССР / А. В. Гурский. – М.-Л.: АН СССР, 1957. – 301 с.
26. Гурьев Д. Г. Формовое разнообразие дуба черешчатого в лесах Чувашской АССР: автореф. дис... к.с.-х.н. / Д. Г. Гурьев – Йошкар-Ола: Мар ПТИ., 1972. – 24 с.
27. Данилов М. Д. Формовое разнообразие дуба черешчатого в условиях северо-восточной части его ареала и вопросы организации лесосеменного дела / М. Д. Данилов. – Йошкар-Ола: Маркнигоиздат, 1969. – 120 с.
28. Денисов А. К. Опыт сортировки желудей по их удельному весу / А. К. Денисов // Лесное хозяйство. – 1955. – №9. – С.81–86.
29. Дорохов Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Клоке Э. // Генетика. – 1997. – Т. 33. – С. 443–450.
30. Доспехов Б. А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных / Б. А. Доспехов. – М.: Колос, 1972. – 206 с.
31. Епринцев А. Т. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов. – Воронеж: Изд-во Воронеж.ун-та, 1999. – 192 с.
32. Ефимов Ю. П. Влияние осадков на прирост дуба черешчатого ранней и поздней форм в Центральной лесостепи / Ю. П. Ефимов // Сб. науч. тр. Генетика, селекция и интродукция лесных пород. Воронеж. – 1974. Вып.1. – С. 70–79.

33. Жимулев И. В. Общая и молекулярная генетика / И. В. Жимулев. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. Ун-та, 2002. – 459 с.

34. Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров: Методические рекомендации / С. В. Малышев [и др.]. – Мн., 2006. – 28 с.

35. Исаев А. С. Методические аспекты использования дистанционных методов в лесобиологических исследованиях / А. С. Исаев, Ф. И. Плешаков // Методологические основы разработки и реализации комплексной программы развития региона. – Новосибирск, 1988. – С. 174 – 185.

36. Использование метода произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD-PCR) для изучения генетической изменчивости основных лесобразующих пород Беларуси / А.Е. Силин [и др.] // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Вып. 55: Проблемы лесоведения и лесоводства. Гомель, 2002. – С. 151–161.

37. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: науч.-метод. руководство / [под ред. Ю.М.Сиволапа]. – К.: Аграрная наука, 1998. – 156 с.

38. Каган Д. И. Популяционно-генетическая структура дуба черешчатого в лесосеменных плантациях и насаждениях белорусского полесья: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.03.01 / Д.И. Каган; Ин-т леса НАН Беларуси; науч. рук. В. Е. Падутов. – Гомель, 2012. – 24 с.

39. Каган Д. И. Популяционно-генетический анализ насаждений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) юга Беларуси на основе использования RAPD-маркеров / Д. И. Каган, О. А. Ковалевич, А. В. Матвеев // В сб. Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе. Матер. Междунар. Науч.-практ. конф. – Гомель, 2009. – С. 59–63.

40. Калаев В. Н. Использование методов молекулярно-генетического анализа для изучения полиморфизма ДНК растений рода RHODODENDRON с це-

лью их паспортизации / В. Н. Калаев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – Т. 6. №2. – С. 323–328.

41. Калаев В. Н. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *rhododendron* / В.Н. Калаев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – Т. 5. №1. – С. 148–152.

42. Календарь Р. Н. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами / Р. Н. Календарь, Ю. М. Сиволап // Биополимеры и клетка. –1995. – №3-4. – С. 55–65.

43. Карандина С. Н. Особенности роста дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в Прикаспийской низменности / С. Н. Карандина. – М.: Изд. АН СССР., 1963. – 90 с.

44. Карандина С. Н. Рост и развитие дуба во впадинах Западного Казахстана / С. Н. Карандина. – М.: Наука., 1966. – 83 с.

45. Киль В. И. Полиморфизм ДНК различных видов клопов по RAPD-маркерам / В. И. Киль [и др.] : [сайт] http://www.rusbio.biz/ru/nb2006_24.shtml / (дата обращения: 15.06.2011).

46. Климович В. И. Размножение и выращивание декоративных древесных пород / В. И. Климович, И. В. Климович. – М.: Россельхозиздат, 1980. – 157 с.

47. Кутлунина Н. А. Цитогенетическая характеристика и генетическое разнообразие *Tulipariparia* на Южном Урале / Н. А. Кутлунина, А. Ю. Беляев, М. И. Жеребцова // Биоразнообразие и биоресурсы Урала и сопредельных территорий: материалы III междунар. науч. конф. Оренбург: Принт-сервис. – 2006. – С. 78–79.

48. Лебедева Н. В. Биоразнообразие и методы его оценки / Н. В. Лебедева, Н. Н. Дроздов, Д. А. Криволицкий. – М.: МГУ, 1999. – 94 с.

49. Лебкова Н. П. Современные представления о внутриклеточных механизмах обеспечения энергетического гомеостаза в норме и при патологии / Н. П. Лебкова // Вестник РАМН. – 2000. – № 9. – С. 6–22.

50. Левонтин Р. Генетические основы эволюции / Р. Левонтин. – М.: Мир, 1978. – 352с.
51. Лосицкий К. Б. Дуб. / К. Б. Лосицкий. – М.: Лесная пром-ть, 1981. – 101 с.
52. Малер Г. Основы биологической химии / Г. Малер, Ю. Кордес. – М.: Мир, 1970. – 568 с.
53. Манская С. М. Хинная и шикимовая кислоты в растениях / С. М. Манская, Л. А. Кодина // Докл. Акад. Наук СССР. – 1958 – № 4. – С. 733–735.
54. Марченко М. М. Характеристика электрофоретических спектров эстеров эксплантов *Saussurea discolor* (Willd.) DC. и *Saussurea porcii* Degen / М. М. Марченко // Біотехнологія. – Т. 4. № 2. – 2011. – С. 80–91.
55. Мигунова Е. С. Лесонасаждение на засоленных почвах / Е. С. Мигунова. – М.: Лесная пром-ть, 1978. – 144 с.
56. Милютин Л. И. О некоторых проблемах исследования биоразнообразия лесов / Л. И. Милютин // Биологическое разнообразие лесных экосистем (Матер. Всерос. Совещ. в Москве) – 1995. – С. 34 – 35.
57. Милютина Т. Н. Молекулярно-генетические исследования плюсовых деревьев сосны обыкновенной на коллекционно-маточном участке / Т. Н. Милютина, П. С. Новикова, О. В. Шейкина // Лесные экосистемы в условиях изменения климата: биологическая продуктивность, мониторинг и адаптационные технологии. – 2010. – С. 81–84.
58. Морозов Г. П. Биологические особенности древесных пород с генетико-эволюционной точки зрения / Г. П. Морозов // Научные основы селекции хвойных древесных пород – М.: Наука, 1978. – С. 27–44.
59. Никольс Д. Дж. Биоэнергетика: Введение в хемиосмотическую теорию / Д. Дж. Никольс. – М.: Мир, 1985. – 190 с.
60. Носов А. М. Вторичный метаболизм / А. М. Носов // Физиология растений под ред. И.П. Ермакова. – М., 2005. – С. 588–614.
61. Основы биохимии / [под ред. А. Ленинджера]. В 3 т. – М.: «Мир», 1985. – 1056 с.

62. Островной Д. В. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ / Д. В. Островной: [сайт]. – <http://www.gmpua.com/Biotechnology/UA/Ref/PCR.htm> (дата обращения: 15.06.2011).

63. Падутов В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

64. Политов Д. В. Применение молекулярных маркеров в лесном хозяйстве для идентификации, инвентаризации и оценки генетического разнообразия лесных ресурсов / Д. В. Политов // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 3-4. – С. 24–27.

65. Попов В. Н. Принципы и основные методы генетической инженерии: Учебное пособие / В. Н. Попов, О.С. Машкина. – Изд-во ВГУ, 2009. – 39 с.

66. Пятницкий С. С. Курс дендрологии / С. С. Пятницкий. – Харьков: Госуниверситет, 1960. – 417 с.

67. Пятницкий С. С. Селекция дуба / С. С. Пятницкий. – М.-Л.: Гослесбумиздат, 1954. – 147 с.

68. Погребняк П. С. Основы лесной типологии / П. С. Погребняк. – Изд-е 2-е исправ. и доп. – Киев: АН УССР, 1955. – 456 с.

69. Потенко В. В. Генетическая изменчивость и дифференциация популяций дуба зубчатого (*Quercus dentate* Thunb.) и дуба монгольского (*Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.) на юге Дальнего Востока России / В. В. Потенко, О. Г. Корень, В. П. Верховат // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 489–498.

70. Придня М. В. Выявление и сохранение биологического разнообразия горнолесных экосистем на Западном Кавказе / М. В. Придня // Биоразнообразие лесных экосистем (Матер.Всерос. Совещ. в Москве, ноябрь 1995) – М., 1995. – С. 203 – 205.

71. ПЦР «в реальном времени» / Ребриков Д.В. [и др.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

72. Рахманкулова З. Ф. Рост и дыхание растений разных адаптивных групп при стрессе / З. Ф. Рахманкулова, И. Ю. Усманов, Г. А. Рамазанова // Тезисы II (X) съезда Русского ботанического общества (26-29 мая 1998 г., Санкт-Петербург). – 1998. – С. 193–194.

73. Редькина Н. Н. Высокая пространственная структурированность аллозимных генотипов в изолированной популяции дуба черешчатого *Quercus robur* L. (Fagaceae) / Н.Н. Редькина [и др.] // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 8. – С. 1141–1144.

74. Рекомендации по генетической инвентаризации объектов лесосеменной базы и их использованию: утв. М-вом лесного хозяйства Респ. Беларусь 06.03.12 / А. И. Ковалевич [и др.]. – Минск, 2012. – 50 с.

75. Рысин Л. П. Концепция биоразнообразия лесных экосистем и лесная типология / Л. П. Рысин // Биологическое разнообразие лесных экосистем. – 1995. – С. 40 – 43.

76. Сальников А. В. Субклеточная локализация изоформ изоцитратлиазы в разных сортах амаранта / А. В. Сальников [и др.] / В сб. Организация и регуляция биохимических процессов. Вып.13. ВГУ. – 2011. – С. 147–151.

77. Семерикова С. А. Генетическая изменчивость пихты сибирской (*Abiessibirica* Ledeb.), изучаемая по AFLP-маркерам / С. А. Семерикова, В. Л. Семериков // Генетика. – 2011. – Т. 47. № 2.– С. 272–278.

78. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке / В. П. Скулачев. – М.: Наука, 1969. – 439 с.

79. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи / В. П. Скулачев. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. – 156 с.

80. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран / В. П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.

81. Смертин Е. Е. Дуб пирамидальный – в защитные лесные насаждения Нижнего Поволжья / Е. Е. Смертин, Е. М. Смертин // Лесное хозяйство. № 5. М.: ВО Агропромиздат. – 1988. – С.40–41.

82. Созинов А. А. Использование генетических методов в селекции / А. А. Созинов // Достижения сельскохозяйственной науки. – М.: Наука, 1985. – С. 91–108.
83. Стародубцева В. В. Современное состояние и перспективы сохранения и воспроизводства селекционно-генетических ресурсов дуба черешчатого в Республике Марий Эл: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.03.01. Екатеринбург: Марийский гос. техн. ун-т, 1999. – 22 с.
84. Сухарев А. Е. Иммунохимическое изучение гидролаз и острофазных белков в слюне беременных с гестозами / А. Е. Сухарев [и др.]. // Фундаментальные исследования. № 9. – 2005. – С. 90–91.
85. Тимофеев-Ресовский Н. В. Очерк учения о популяции / Н. В. Тимофеев-Ресовский, А. В. Яблоков, Н. В. Глотов. – М.: Наука, 1973. – 277 с.
86. Тихонов С. Т. Анализ роста культур дуба, заложенных посевом и посадкой / С. Т. Тихонов // Сб. тр. по лесн. хоз-ву. ТатЛЮС. – 1970. – Вып.18. – С. 57–64.
87. Уткин А. И. Таксономическое разнообразие древесных пород и продукционная инвариантность / А. И. Уткин // Биологическое разнообразие лесных экосистем. – М., 1995. – С. 44–47.
88. Филимонова Л. В. Размножение дуба черешчатого пирамидальной формы для защитного лесоразведения в Нижнем Поволжье: автореф. дис.... канд. с.-х. наук / Л. В. Филимонова. – Волгоград, 1999. – 35 с.
89. Хавкин Э. Е. ДНК-технологии в растениеводстве / Э. Е. Хавкин // С-х. биол. – 2003. – №3. – С. 26–41.
90. Хлесткина Е. К. Генотипирование отечественных сортов мягкой пшеницы с использованием микросателлитных (SSR) маркеров / Е. К. Хлесткина [и др.] // С-х. биол. – 2004. – №5. – С. 44–51.
91. Чеведаев А. А. Дуб, его свойства и значение / А. А. Чеведаев. – М.: Гослесбумиздат, 1963. – 233 с.
92. Челомина Г. Н. Дискриминация межвидовых гибридов в природных популяциях осетровых рыб Амура с помощью мультилокусных RAPD-PCR

маркеров / Г. Н. Челомина, К. В. Рожкован, С. А. Иванов // Цитология и генетика. – 2008. – № 5. – С. 61–70.

93. Чернодубов А. И. Эфирные масла сосны: состав, получение, использование / А. И. Чернодубов, Р. И. Дерюжкин. – Воронеж: ВГУ, 1990. – 112 с.

94. Черноусова Е. Ю. Биоразнообразие нитчатых сероокисляющих бактерий сульфидных экосистем Северного Кавказа: экологические и молекулярно-генетические аспекты: автореф. дис.... канд. биол. наук / Е. Ю. Черноусова. – Воронеж, 2011. – 24 с.

95. Чесноков Ю. В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений / Ю. В. Чесноков // С-х. биол. – 2005. – №1. – С. 20–40.

96. Шутяев А. М. Биоразнообразие дуба черешчатого и его использование в селекции и лесоразведении / А. М. Шутяев. – Воронеж, 2000. – 336 с.

97. Эйтинген Г. Р. Лес в степи / Г. Р. Эйтинген. – М.: Сельхозгиз, 1954. – 188 с.

98. Экарт А. К. Аллозимный полиморфизм в природных популяциях пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb / А. К. Экарт, А. Я. Ларионова // Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН № 2. Магадан: изд-во «Северо-Восточный научный центр Дальневосточного отделения РАН (Магадан)». – 2010. – 78-85 с.

99. Электронная база данных: NCBI : [сайт]. –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 15.06.2011).

100. Яковлев А. С. Дубравы Среднего Поволжья / А. С. Яковлев, И. А. Яковлев. – Йошкар-Ола: МарТУ, 1999. – 352 с.

101. Яковлев И. А. Генетическая дифференциация дуба черешчатого (*Quercus robur*L.) в европейской части России на основе RAPD-маркеров / И. А. Яковлев, Й. Клейншмит // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 2. – С. 207–215.

102. Яковлев А. С. Лесные культуры дуба / А. С. Яковлев. – Учебное пособие. Горький: Изд-во ГГУ, 1980. – 122 с.

103. Adams M. D. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project / M. D. Adams [et al.] // *Science*. – 1991. – V. 252. – P. 1651–1656.
104. Arber W. Promotion and limitation of genetic exchange / W. Arber // *Science*. – 1979. – V. 205. – P.361–365.
105. Barreneche T. Two dimensional gel electrophoresis confirms the low level of genetic differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. / T. Barreneche, N. Bahrman, A. Kremer // *Forest Genetics*. – 1996. – Vol. 3, № 2. – P. 89–92.
106. Bartlett J. M. S. A Short History of the Polymerase Chain Reaction / J. M. S. Bartlett, D. Stirling // *Methods in Molecular Biology*. – 2003. – V. 226. N I. –P. 3–6.
107. Beckmann J. S. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs / J. S. Beckmann, M. Soller // *Theor. Appl. Genet.* – 1983. – V. 67. – P. 35–43.
108. Beckmann J. S. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species / J. S. Beckmann, M. Soller // *Euphytica*. –1986. – V. 35. – P. 111–124.
109. Birch N. Characterization of an aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles / N. Birch, P.Loh // *Soc. Neurosci. Abstr.* – 1986. – 12. – P. 1047.
110. Bordacs S. Genetic differentiation by RAPD markers of oak species in Hungary / S. Bordacs, K. Burg // *Diversity and adaptation in oak species: proc. of meeting WG 2.08.05, IUFRO / Penn. state univ.; ed. SteinerK.* – Pennsylvania, 1997. – P. 121–131.
111. Bodenes C. General vs. local differentiation between two closely related white oak species / C. Bodenes [et al.] // *Mol. Ecol.* – 1997. – Vol. 6. – P. 713–724.
112. Botstein D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1980. – V. 32. – P.314–331.

113. Brettschneider R. Non-radioactive AFLP method, based on Digoxigenine / R. Brettschneider // Molecular Screening News. – 1996. – Vol. 9. – P. 13–14.
114. Caetano-Anolles G. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers / G. Caetano-Anolles, B.J. Bassam, P.M. Gresshoff // BioTechnology. – 1991. – V. 9. – P. 553–557.
115. Charlson D. Associating SSR-markers with soybean resistance to iron deficiency Chlorosis / D. Charlson, S. Cinzio, R. Shoemaker // Journal of Plant Nutrition. – 2003. – V.26. № 10-11. – P. 2267–2276.
116. Cheliak W. M. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species / W. M. Cheliak, J. A. Pitel. – Ottawa: Canadian Forestry Service, 1984. – 49 p.
117. Coelho A. C. Genetic diversity of two evergreen oaks (*Quercus suber* L. and *Q. (ilex) rotundifolia* Lam.) in Portugal using AFLP markers / A. C. Coelho, M. B. Lima, D. Neves, A. Cravador // Silvae Genetica. – 2006. – V.55. – P.105–118.
118. Davis W. L. Evidence for the glyoxylate cycle in human liver / W. L. Davis, D. B. Goodman // Source Anatomical Record. – 1992. – V. 234, № 4. – P. 461–468.
119. Davis W. L. Hibernation activates glyoxylate cycle and gluconeogenesis in black bear brown adipose tissue / W. L. Davis, D. B. Goodman, L. A. Crawford // BiochimBiophysActa. – 1990. – Vol.1051, N. 3. – P. 276–278.
120. Devine T. E. Simultaneous genetic mapping of morphological and biochemical traits in the soybean / T. E. Devine, Y. T. Kiang, M. B. Gorman // The Journal of Heredity. – 1984. – № 75. – P.311–312.
121. Diwan N. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean / N. Diwan, P.B. Cregan // Theor. Appl. Genet. – 1997. – V.95. №5-6. – P. 723–733.
122. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // Phytochemical Bulletin. – 1991. – V.1. – P.11–15.

123. Durante M. Variation in DNA complexity in *Nicotiana glauca* tissue cultures. I. Pith tissue dedifferentiation in vitro / M. Durante [et al.] // *Protoplasma*. – 1983. – V. 144. – P. 114–118.
124. Edwards K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis / K. Edwards, C. Johnstone, C. Thompson // *Nucl. Acid Res.* – 1991. – V. 19. №6. – P. 1349.
125. Edwards K.J. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants / K.J. Edwards [et al.] // *Biotechniques*. – 1996. – Vol. 20. – P. 758–760.
126. Finkeldey R. Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 3. Lack of impact of postglacial recolonization history on nuclear gene loci / R. Finkeldey, G. Matyas // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106, № 2. – P. 346–352.
127. Fungal Degradation and Discolouration of Scots Pine / Uirika Raberg / Faculty of Forest Sciences / Department of Wood Science / Uppsala, 2006. – 38 p.
128. Galperin M. Y. The Molecular Biology Database Collection: 2005 update / M. Y. Galperin // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – P. D5 – D24.
129. Garvin D. F. Genetic mapping of the barley Rrsl4 scald resistance gene With RFLP, isozyme and seed storage protein markers / D. F. Garvin [et al.] // *Plant Breeding*. – 2000. – №119. – P. 193–196.
130. Gesteira A. S. RAPD based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis / A. S. Gesteira [et al.] // *Plant Breeding*. – 2002. – V. 121. – P. 269–271.
131. Glaz I. Genetic cartography of oaks in Poland using PCR-RFLP markers of the chloroplast DNA / I. Glaz // *Glas. sum. pokuse.* – Zagreb, 2000. – Vol. 37. – P. 481–487.
132. Guhetl S. Z. Development of marker system for identification and certification of sunflower lines and hybrids on the basis of SSR-analysis / S. Z. Guhetl [et al.] // *Helia*. – 2006. – Vol. 29. № 45. – P. 63–72.

133. Gupta M. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats / M. Gupta [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – V. 89. – P. 998–1006.
134. Hadrys H. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology / H. Hadrys, M. Balick, B. Schierwater // *Molecular Ecology.* – 1992. – V. 1. – P. 55–63.
135. Hamrick J. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species / J. L. Hamrick, M. J. W. Godt, S. L. Sherman-Broyles // *New Forests.* – 1992. – Vol. 6. – P. 95–124.
136. Hatada I. A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks / I. Hatada [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88. – P. 9523–9527.
137. He C. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars / C. He, V. Poysa, K. Yu // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – V. 106. – P. 363–373.
138. Hossain K. G. Characterization and identification of (CT)_n microsatellites in soybean using sheared genomic libraries / K. G. Hossain [et al.] // *DNA Research.* – 2000. – №7. – P. 103–110.
139. Hu J. Identification of broccoli and cauli flower cultivars with RAPD markers / J. Hu, C.F. Quiros // *Plant Cell Reports.* – 1992. – V. 10. – P. 505–511.
140. Hubby J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura* / J.L. Hubby, R.C. Lewontin // *Genetics.* – 1966. – V. 54. N 2. – P. 577–594.
141. Jeffreys A. J. Hypervariable DNA and genetic fingerprints / A. J. Jeffreys, J. Hillel, N. Hartley // *Anim. Genet.* – 1987. – Vol. 18. Suppl.1. P. 141.
142. Jeffreys A. J. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA / A. J. Jeffreys, V. Wilson, S. L. Thein // *Nature.* – 1985. – V. 316. N 6023. – P. 76–79.

143. Jhormann C. E. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species / C. E. Jhormann [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – V.88. – P.930–980.
145. Kashani N. Genetic Differentiation of Two California Red Oak Species, *Quercus parvula* var. *shrevei* and *Q. wislizeni*, based on AFLP Genetic Markers / N. Kashani, R.S. Dodd // *USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-184.* – 2002. – P. 417–426.
146. Kremer A. Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? / A. Kremer [et al.] // *For. Ecol. Manag.* – 2002. – Vol. 156. – P. 75–87.
147. Ledig F. T. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants / F. T. Ledig // *Conservation biology: the science of scarcity and diversity.* – Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 1986. – P. 77–104.
148. Liber Z. DNA polymorphisms in Austrian and Dalmatian black pine / Z. Liber, Z. Palvetić, T. Nicolić // *Wiss. Mitt. Niederösterr. Landesmuseum.* – 1999. – V.12. – P.53–62.
149. Lumaret R. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.) / R. Lumaret [et al.] // *Mol. Ecol.* – 2002. – Vol. 11. – P. 2327–2336.
150. Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / T. Maniatis, J. Sambrook, E.F. Fritsch. – Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. – 321 p.
151. Mapping Plant Genomes With Molecular Markers / The Classes of Molecular Markers : [сайт]. – <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/mapping/mapping1.htm> (дата обращения: 15.06.2011).
152. Millar C. I. Allozyme variation of bishop pine associated with pygmy-forest soil in northern California / C. I. Millar // *Can. J. For. Res.* – 1989. – V. 19. – P. 870–879.

153. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 561–591.
154. Moreau F. Molecular differentiation between *Q.petraea* and *Q.robur* assessed by random amplified DNA fragments / F. Moreau, J.R.G. Kleinschmit, A. Kremer // *Forest Genetics.* – 1994. – Vol. 1. – P. 51–64.
155. Mueller U. G. AFLP genotyping and fingerprinting / U. G. Mueller, L. L. Wolfenbarger // *Trends EcolEvol.* – 1999. – V.14. N 10. – P.389–394.
156. Neale D. B. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and application to forest genetic and tree improvement / D. B. Neale, C. G. Williams // *Can. J. For. Res.* – 1991. – V.21. – P.543–554.
157. Nei M. *Molecular evolutionary genetics.* N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. – 512 p.
158. Nevo E. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates / E. Nevo, A. Beiles, R. Ben-Shlomo // *Lecture Notes in Biomathematic* / ed. G.S.Mani. – 1984. – Vol. 53: *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity.* – P. 13–213.
159. Ohsawa T. Genetic Diversity and Gene Flow of *Quercus crispulaina* Semi-Fragmented Forest Together With Neighboring Forest / T. Ohsawa [et al.] // *Silvae Genetica.* – 2006. – V. 55. N 4/5. – P. 160–169.
160. Olalde M. White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula / M. Olalde [et al.] // *For. Ecol. Manag.* – 2002. – Vol. 156. – P. 89–102.
161. Olson M. A common language for physical mapping of the human genome / M. Olson, L. Hood, C. Carton, D. Botstein // *Science.* – 1989. – V. 245. N.4925. – P. 1434–1435.
162. Paran J. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce / J. Paran, R.W. Michelmore // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V.85. – P.985–993.

163. Petit R.J. Ribosomal DNA and chloroplast DNA polymorphisms in a mixed stand of *Quercus robur* and *Q. petraea* / R. J. Petit, D. B. Wagner, A. Kremer // *Geneticsofoaks*. – Paris: Elsevier, 1993. – P. 41–48.
164. Rakhmankulova Z. F. Alternative Respiration Pathways and Secondary Metabolism in Plants with Different Adaptive Strategies under Mineral Deficiency / Z. F. Rakhmankulova // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2003. – V. 50, N. 2. – P. 206–212.
165. Rosner D. How does DNA Fingerprinting Work?: [сайт]. – URL: <http://www.thenakedscientists.com/HTML/articles/article/dalyacolumn8.htm/> (дата обращения: 15.06.2011).
166. Saiki R.K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. / R.K. Saiki [et al.] // *Science*. – 1988. – V. 239. – P. 487–491.
167. Steen S.W. Handbook for DNA isolation, RAPD-PCR and PCR-RFLP / S.W. Steen. – Oslo: Botanical Garden and Museum, Unive. of Oslo., 1999. – 12 p.
168. Tsumura Y. Genetic structure of geographical marginal populations of *Cryptomeria japonica* / Y.Tsumura, K .Ohba // *Jap. J. Genet.* – 1993. – V. 68. – P. 859–863.
169. Vornam B. Restriction fragment length polymorphism of a chloroplast photo-system II gene from poplar and their use for species identification / B. Vornam [et al.]// *Genome*. – 1994. – V.36. – P.747–750.
170. Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P.Vos [et al.] // *Nucl. AcidsRes.* – 1995. –V. 23. N 21. – P. 4407–4411.
171. Welsh J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers / J. Welsh, M. McClelland // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – V. 18. – P.7213–7218.
172. Welsh J. Polymorphism generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping / J. Welsh, Ck. Petersen, M. McClelland // *Nucleic Acids Research*. – 1990. – Vol.19. N 2. – P.303–306.
173. Werner O. Genetic differentiation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in Rhineland-Palatinate based upon RAPD markers / O. Werner [et al.] // *Di-*

versity and adaptation in oak species: proc. of meeting WG 2.08.05, IUFRO / Penn. state univ.; ed. Steiner K. – Pennsylvania, 1997. – P. 22–36.

174. Which DNA Marker for Which Purpose. Final Compendium of the Research Project Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union / URL; E.M. Gillet (lead.), DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. – Frankfurt, 1999. – 253 p.

175. Williams J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G.K. Williams [et al.] // Nucleic Acids Research. – 1990. – V.18. N 22. – P.6531–6535.

176. Wikipedia : [сайт]. URL: <http://ru.wikipedia.org/wiki/> (дата обращения: 14.07.2013).

177. Williams J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. Williams [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1990. – V.18. P. 6531–6535.

178. Xie C. Y. Associations between allozyme phenotypes and soil nutrients in a natural population of Jack pine (*Pinusbanksiana*) / C. Y. Xie, P. Knowles // Biochem. Syst. Ecol. – 1992. – V. 20. № 2. – P. 179–185.

179. Xu D.N. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean / D.N. Xu, J. Abe, Y. Shimanoto // Teor. Appl. Genet. – 2002. – V. 105. №5. – P. 645–653.

180. Zanetto A. Inheritance of isozymes in pedunculate oak (*Quercusrobur*L.) / A. Zanetto [et al.] // Heredity. – 1996. – Vol. 87, № 5. – P. 364–370.

181. Zanetto A. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercuspetraea* (Matt.) Liebl. / A. Zanetto, G. Roussel, A. Kremer // Forest Genetics. – 1994. – Vol. 1, № 2. – P. 111–123.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

РЕЦЕПТУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОКРАШИВАЮЩИХ РАСТВОРОВ И МЕТОДИКА ОКРАШИВАНИЯ ГЕЛЕВЫХ СРЕЗОВ

Гелевые срезы, помещенные в кювету или на стекло, предварительно прогреваются в термостате при температуре 37°C в течение 15 мин. Процедура окрашивания также производится в термостате при 37°C в темноте до четкого проявления окрашенных фракций изоферментов (для большинства изоферментов от 10 до 30 мин, в редких случаях до 3–4 ч).

Для покрасок с агарозными репликами готовится раствор агарозы: 1,9 г агарозы заливаются 150 мл дистиллированной воды и нагреваются на водяной бане до растворения агарозы. В процессе проведения покрасок содержится на водяной бане при $t=90-100^{\circ}\text{C}$.

Аланинаминопептидаза (ALAP, КФ 3.4.11.2)

1 стакан

0,1М трис-малеиновый буферный раствор, pH 5,4	-	5 мл
L-аланин- β -нафтиламид	-	10 мг
MgCl ₂	-	300 мг

2 стакан

Прочный гранатовый ГБЦ соль (черный К соль)	-	30 мг
ДМФА	-	1 мл
1 М р-р борной к-ты	-	5 мл
р-р агарозы	-	10 мл

Окраска проводится в два этапа. Вначале содержимое 1 стакана равномерно наносится на гелевый срез, который помещается в термостат на 15–20 мин. Затем к содержимому 2 стакана приливается охлажденный под проточной водой до 40–45°C раствор агарозы. По окончании окраски реплика смывается с геля.

Алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1)

1 стакан

0,5М трис-НСl буферный раствор, рН 8,0	-	5 мл
H ₂ O	-	5 мл
Этанол 96%	-	2 мл
НАД	-	10 мг
MgCl ₂	-	3 мг

2 стакан

H ₂ O	-	5 мл
ТНСТ 4% р-р в ДМФА	-	0,1 мл
ФМС	-	0,5 мг

Окраска ADH возможна с одновременным окрашиванием GDH. При совмещенном окрашивании этанол необходимо добавлять после появления фракций GDH.

Глюкозофосфатизомераза (GPI, КФ 5.3.1.9)

1 стакан

0,5М трис-НСl буферный раствор, рН 8,0	-	5 мл
фруктозо-6-фосфат (натриевая соль)	-	10 мг
НАДФ	-	15 мг
MgCl ₂	-	3 мг

2 стакан

H ₂ O	-	5 мл
НСТ	-	10 мг
ФМС	-	0,5 мг
р-р агарозы	-	10 мл

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа - 25 ед.

Содержимое 1 и 2 стаканов смешивается и приливается охлажденный под проточной водой до 45–50°C раствор агарозы. Смесь перемешивается и к ней добавляется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Изоцитратдегидрогеназа (IDH, КФ 1.1.1.42)

1 стакан

0,5М трис-НСl буферный раствор, рН 8,0 - 5 мл

H₂O - 5 мл

D,L-изолимонная к-та - 10 мг

НАДФ - 10 мг

MgCl₂ - 2 мг

2 стакан

H₂O - 5 мл

ТНСТ 4% р-р в ДМФА - 0,1 мл

ФМС - 0,5 мг

Лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1)

1 стакан

0,1М трис-малеиновый буферный раствор, рН 5,4 - 5 мл

L-лейцин-β-нафтиламид (р-р в 2 мл 96% этанола) - 10 мг

MgCl₂ - 100 мг

2 стакан

прочный гранатовый ГБЦ соль (черный К соль) - 25 мг

ДМФА - 1 мл

1 М р-р борной к-ты - 5 мл

р-р агарозы - 10 мл

Окраска проводится в два этапа. Вначале содержимое 1 стакана равномерно наносится на гелевый срез, который помещается в термостат на 15–20 мин. Затем к содержимому 2 стакана приливается охлажденный под проточной водой до 40–45°C раствор агарозы.

Флюоресцентная эстераза (FE, КФ 3.1.1.2)

4-метилумбеллиферилацетат	-	1 мг
ацетон	-	1 мл
0,1М трис-малеиновый буферный раствор, рН 5,4	-	5 мл

4-Метилумбеллиферилацетат растворяется в ацетоне, затем приливается трис-малеиновый буфер. Гель помещают в термостат на 15–20 мин. Результаты просматриваются под УФ-светом.

Фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1)

1 стакан

0,5М трис-НСl буферный раствор, рН 8,0	-	3 мл
глюкозо-1-фосфат (натриевая соль)	-	40 мг
НАДФ	-	20 мг
глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	-	25 ед.
MgCl ₂	-	3 мг

2 стакан

H ₂ O	-	3 мл
ТНСТ 4% р-р в ДМФА	-	0,1 мл
ФМС	-	0,5 мг
р-р агарозы	-	10 мл

Содержимое 1 и 2 стаканов смешивается и приливается охлажденный под проточной водой до 45–50°С раствор агарозы. Смесь перемешивается и к ней добавляется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Шикиматдегидрогеназа (SKDH, КФ 1.1.1.25)

1 стакан

0,5М трис-НСl буферный раствор, рН 8,0 - 5 мл

H₂O - 5 мл

шикимовая к-та - 40 мг

НАДФ - 10 мг

MgCl₂ - 50 мг

2 стакан

H₂O - 5 мл

ТНСТ 4% р-р в ДМФА - 0,1 мл

ФМС - 0,5 мг

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ГЕНОТИПЫ ДЕРЕВЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО ИЗ ЛЕСОСТЕПИ
ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО 12
ИЗОФЕРМЕНТНЫМ ЛОКУСАМ

Таблица 1 П – Генотипы деревьев Quercus robur по 12 аллозимным локусам

Номер п/п	№ плантации по Госреестру	Gpi-1	Gpi-2	Fe-1	Fe-2	Pgm	Adh-1	Adh-2	Skdh	Lap	Alap-1	Alap-2	Idh
1	48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,15
2	48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,95/0,90	0,95	1,00/1,15
3	48	1,00	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,95	1,00/0,95	1,00/1,15
4	48	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	0,95/0,90	1,00/0,95	1,00/1,15
5	48	1,00	1,00/1,10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
6	48	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00	1,00/1,05	1,00/1,15
7	48	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
8	48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
9	48	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
1	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00	1,00
2	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00	1,00
3	23	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	0,90	1,00/1,05	1,00
4	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
5	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00/0,95	1,05	1,00
6	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95	1,05	1,00
7	23	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00	1,00
8	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
9	23	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	0,90	1,00	1,00/1,10	0,90	1,00/1,05	1,00
1	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00	1,15
2	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,95	1,00	1,00/1,30
3	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,15
4	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
5	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95/0,90	1,05	1,00
6	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,05	1,00/1,15
7	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,30
8	6	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	0,90	1,00/0,85	1,00/0,90	1,00	1,00/1,10	0,90	1,00/0,95	1,00
9	6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,80	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	0,95/0,90	1,00	1,00/1,15
1	19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05/1,10	0,90	1,05	1,00/1,15
2	19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,05/0,95	1,00/1,15

Продолжение таблицы 1 П

Номер п/п	№ плантации по Госреестру	Gpi-1	Gpi-2	Fe-1	Fe-2	Pgm	Adh-1	Adh-2	Skdh	Lap	Alap-1	Alap-2	Idh
3	19	1,00	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	0,95/0,90	1,00	1,00/1,15
4	19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
5	19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	0,95/0,90	1,05	1,00
6	19	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,30
7	19	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00/1,30
8	19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,95/0,90	1,05	1,00/1,15
9	19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/1,15
1	13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
2	13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	0,95/0,90	1,05	1,15
3	13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,15	1,00
4	13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	0,95/0,90	1,00/1,05	1,00
5	13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
6	13	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00	1,15
7	13	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00
8	13	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00/1,15	1,00	1,05	0,90	1,00	1,00
9	13	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	0,85	1,00/1,15	1,00	1,00/1,10	0,95	1,00	1,00
1	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,05/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
2	15	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,05	1,00
3	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,05	1,00
4	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00/1,10	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00
5	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,05	1,15
6	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
7	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00	1,00
8	15	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,95	1,00/1,05	1,00
9	15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,95/0,90	1,00/1,05	1,15
1	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,05	0,90	1,05/1,15	1,15
2	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00	1,00	1,00	1,00/1,15
3	18	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,15

Продолжение таблицы 1 П

Номер п/п	№ плантации по Госреестру	Gpi-1	Gpi-2	Fe-1	Fe-2	Pgm	Adh-1	Adh-2	Skdh	Lap	Alap-1	Alap-2	Idh
4	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
5	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00
6	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
7	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
8	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95	1,00/0,95	1,00
9	18	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
1	24	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	0,95/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
2	24	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
3	24	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	0,95/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
4	24	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90/0,80	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/1,30
5	24	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90/0,80	1,00/0,85	1,00/0,90	1,00	1,00/1,10	0,90	1,05	1,00
6	24	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00	1,00/1,15
7	24	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,95	1,00	1,00/1,15
8	24	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
9	24	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00/1,30
1	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
2	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,10	0,90	1,00/1,05	1,00
3	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,05	1,00
4	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	0,95	1,00	1,00/1,30
5	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
6	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95/0,90	1,00/1,05	1,15
7	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,05/0,95	1,00/1,15
8	20	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00/1,15	1,00	1,05/1,10	0,90	1,00/0,95	1,15
9	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	0,95/0,90	1,05/0,95	1,00
10	20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
1	12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
2	12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,95	0,95	1,00
3	12	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,15

Продолжение таблицы 1 П

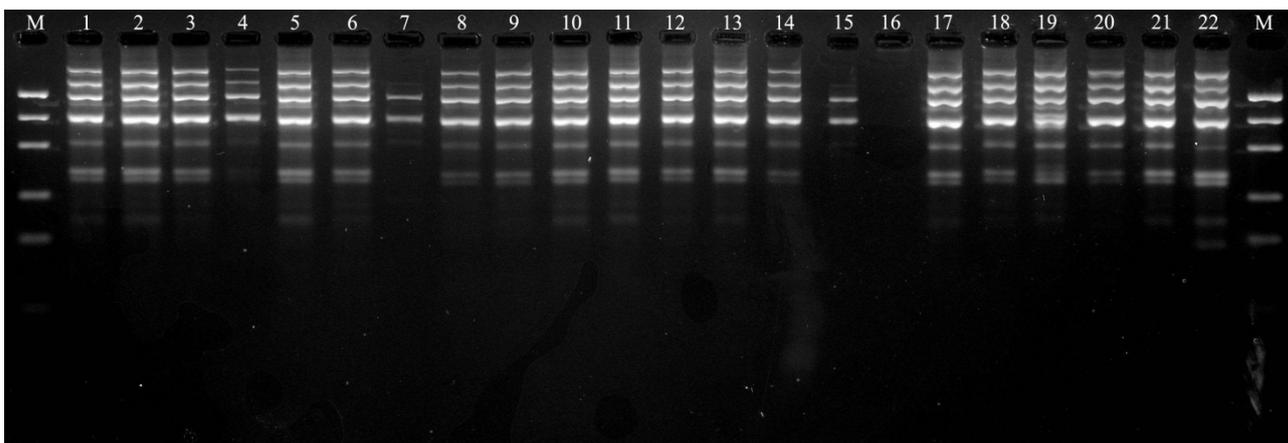
Номер п/п	№ плантации по Госреестру	Gpi-1	Gpi-2	Fe-1	Fe-2	Pgm	Adh-1	Adh-2	Skdh	Lap	Alap-1	Alap-2	Idh
4	12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,95	1,00/0,95	1,00/1,15
5	12	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00/1,15	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00	1,15
6	12	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
7	12	1,00	1,00/1,10	1,00	1,00/1,20	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05	0,90	1,00	1,00/1,30
8	12	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
9	12	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,95	1,00	1,00
1	22	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00
2	22	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
3	22	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95/0,90	1,00	1,00/1,15
4	22	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,15	1,00
5	22	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,30
6	22	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	0,95/0,90	1,00	1,00/1,15
7	22	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00/0,85	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	22	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00
9	22	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/1,05	1,00	1,00/1,05	1,00
1	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95	1,00/1,05	1,15
2	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	0,90	1,00/1,05	1,00
4	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	0,95	1,05	1,00/1,15
5	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95/0,90	1,00/0,95	1,00
6	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,80	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,95	1,00/0,95	1,00
7	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,95	1,00	1,00/1,15
8	27	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00
9	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00/0,95	1,00	1,00/1,15
1	17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95	1,00/1,05	1,15
2	17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,05/1,10	0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
3	17	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00/1,15	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,05	1,00/1,15

Окончание таблицы 1 П

4	17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05	0,90	1,05	1,00/1,15
5	17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05	1,00
6	17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
7	17	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,95	1,00	1,00/1,15
8	17	1,00	1,00	1,00	1,00/1,30	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
9	17	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00
1	21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
2	21	1,00	1,00	1,00	1,00/1,20	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00	1,00/1,15
3	21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00/1,05	1,00/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15
4	21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,30
5	21	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,05/1,10	0,95	1,00	1,00/1,30
6	21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,10	0,95/0,90	1,00	1,00
7	21	1,00	1,00/1,15	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00	1,00	1,00/1,10	1,00/0,90	1,05/0,95	1,00/1,15
8	21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00/1,15	1,00	1,00	1,00/0,90	1,05/0,95	1,00/1,15
9	21	1,00	1,00	1,00/0,90	1,00	1,00/0,90	1,00/0,85	1,00	1,00	1,10	0,95/0,90	1,00/1,05	1,00/1,15

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

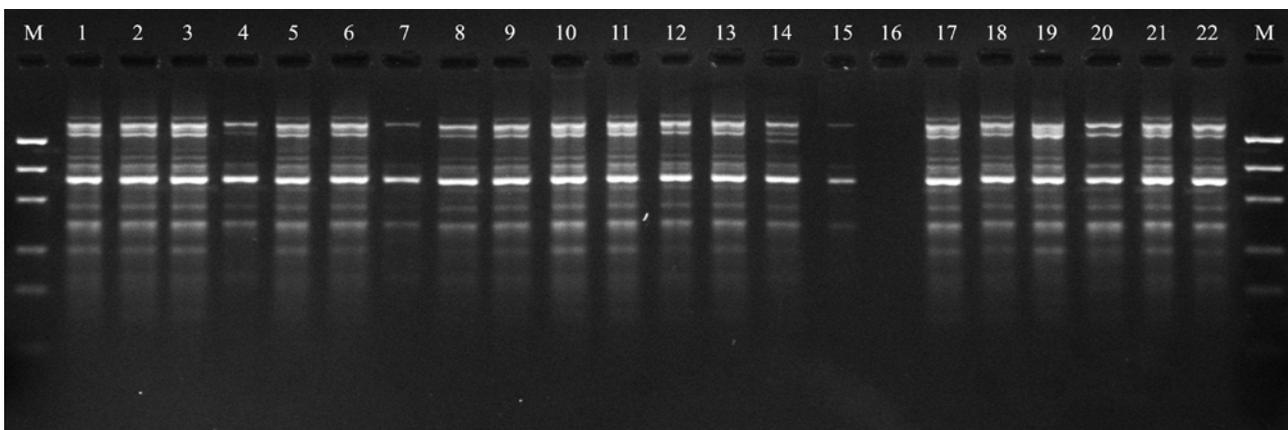
ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММЫ ПРОДУКТОВ ПЦР ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО
ФОРМЫ КОЛОНОВИДНОЙ РАЗНЫХ МЕСТ ПРОИСХОЖДЕНИЯ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 9 RAPD- ПРАЙМЕРОВ



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

1–22 – номер образца

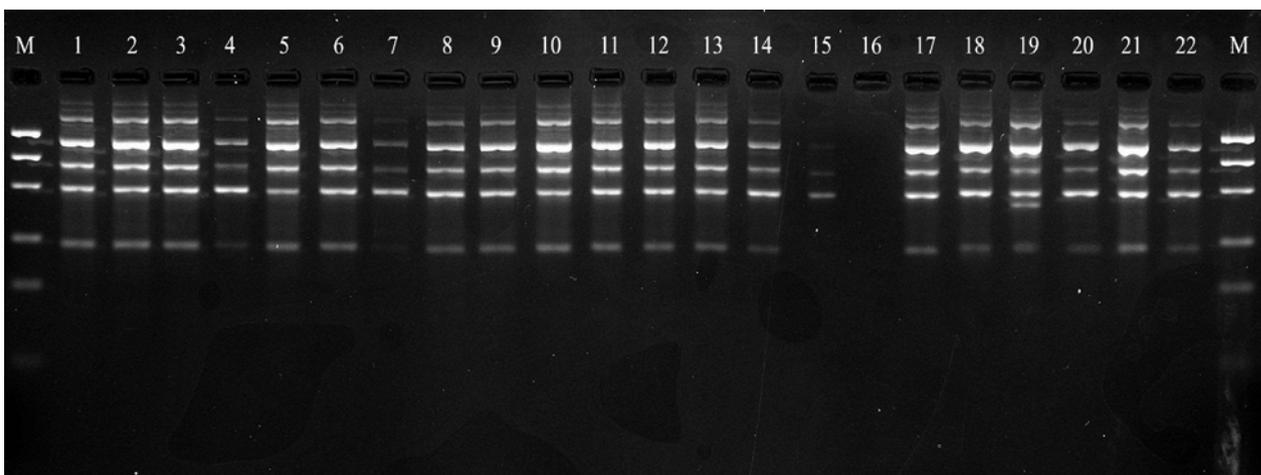
Рис. 1П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 1



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

1–22 – номер образца

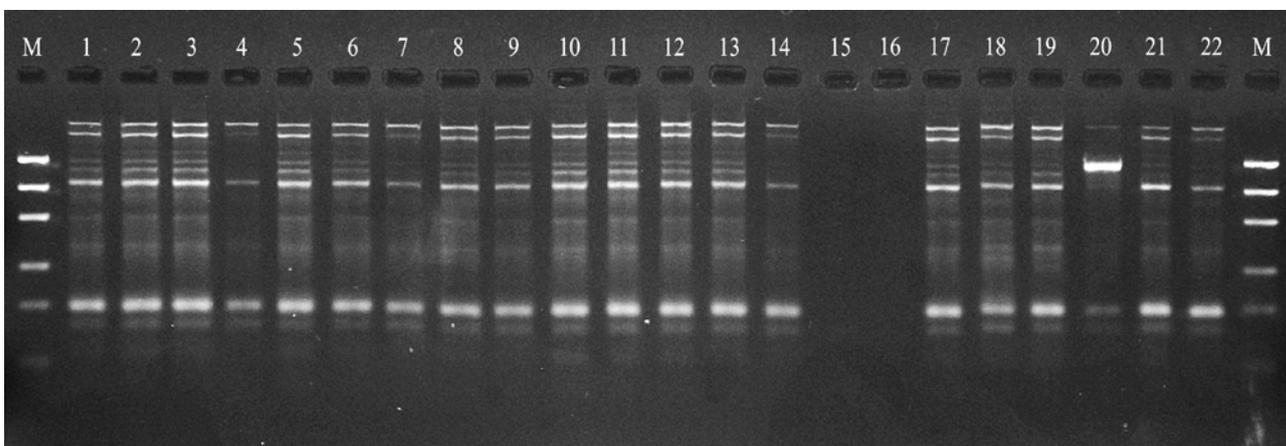
Рис. 2 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 2



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

1–22 – номер образца

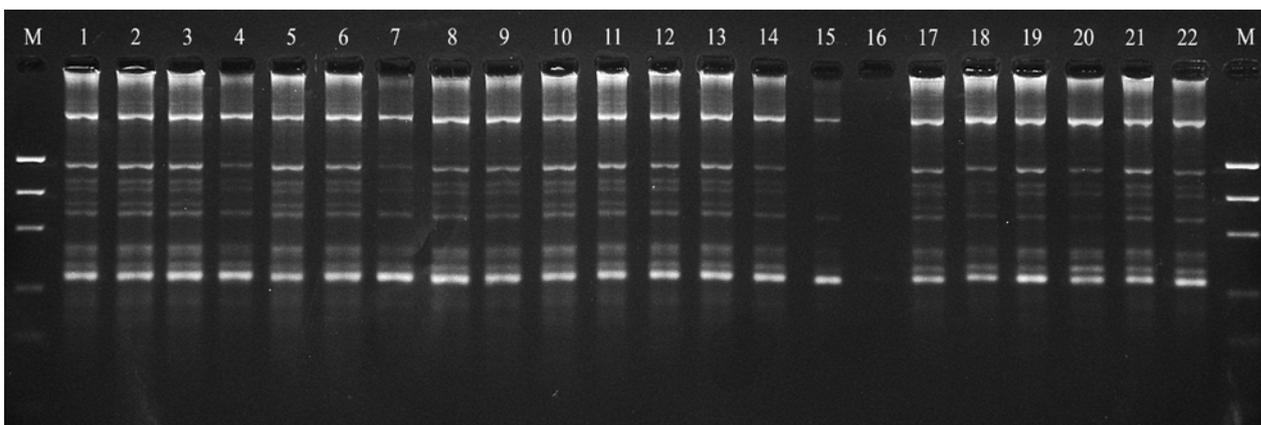
Рис. 3 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 5



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

1–22 – номер образца

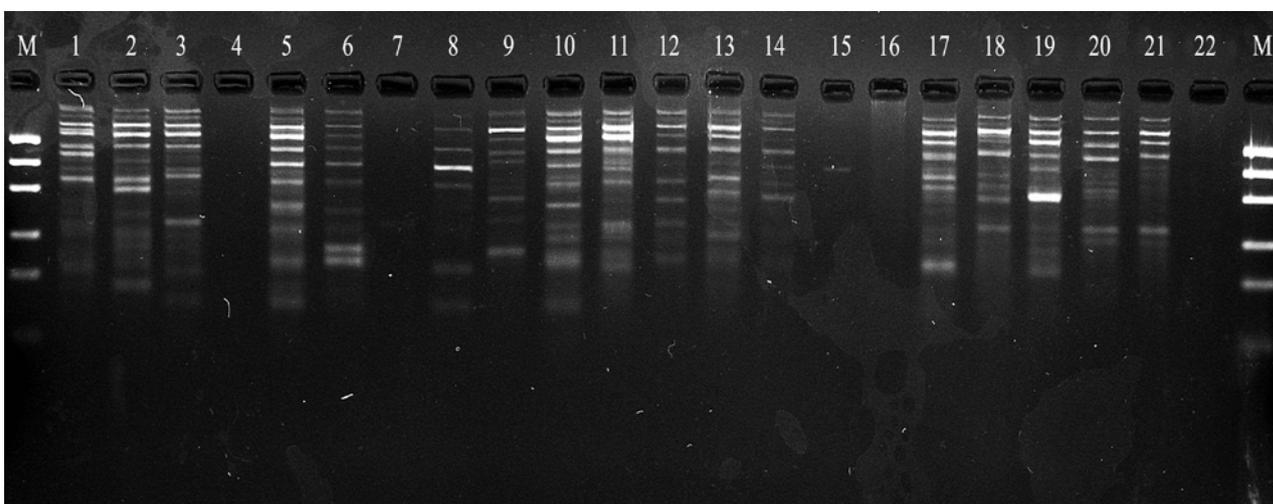
Рис. 4 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 6



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

1–22 – номер образца

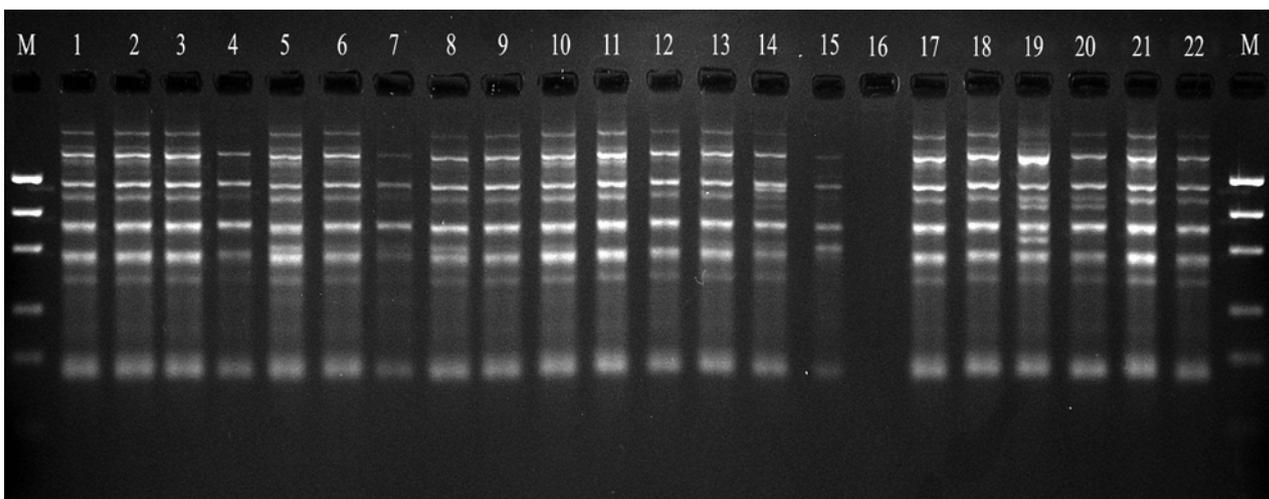
Рис. 5 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 12



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

1–22 – номер образца

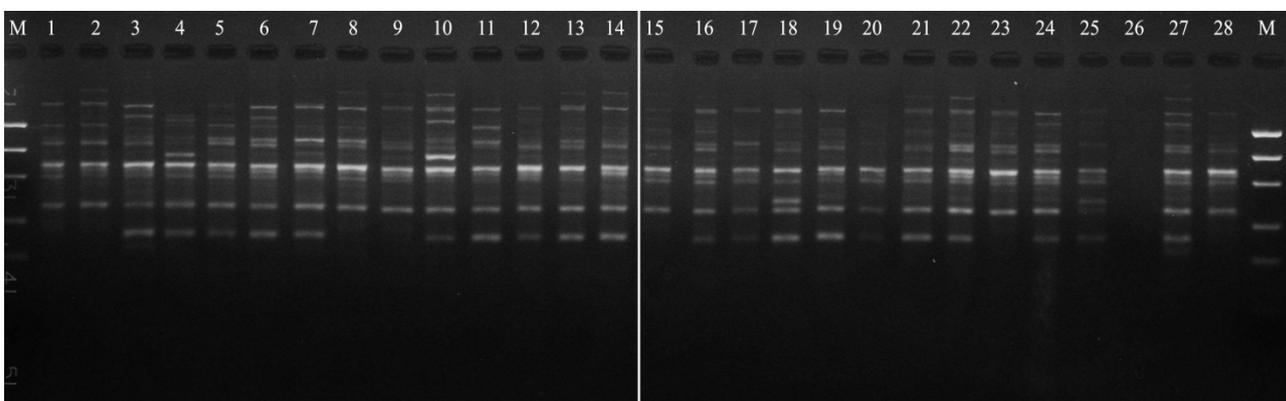
Рис. 6 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 19



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

1–22 – номер образца

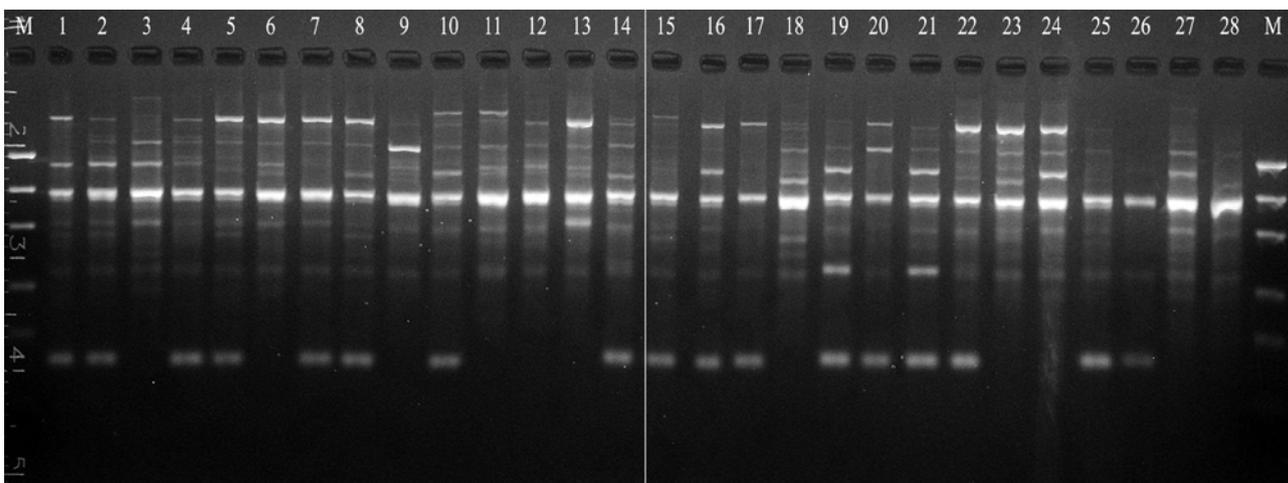
Рис. 7 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы коловидной, произрастающего в г. Воронеже и области, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 29



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

№№ 1–14 – г. Воронеж; №№ 15–28 – г. Волгоград

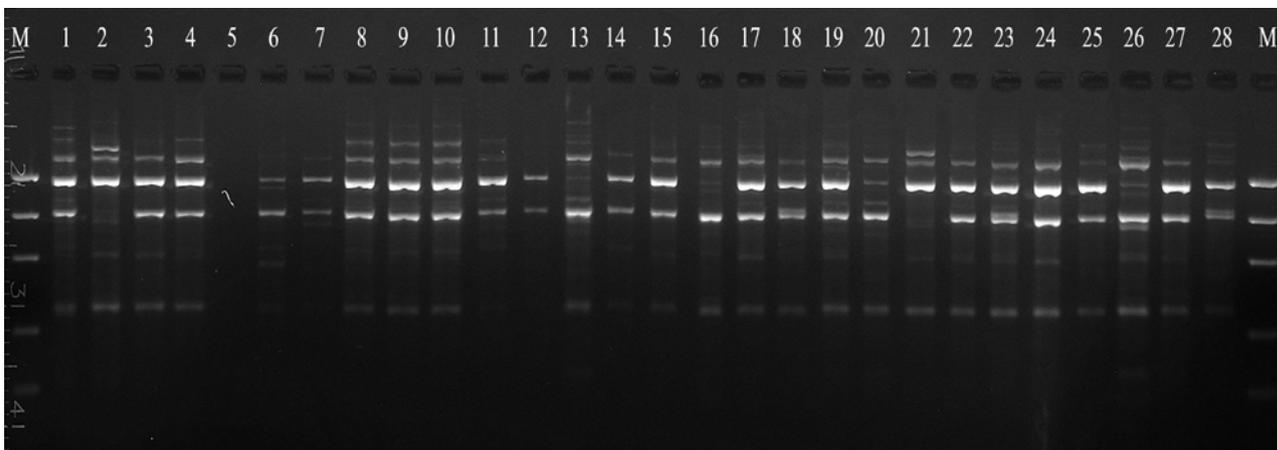
Рис. 8 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы коловидной произрастающего в г. Воронеже и из г. Волгограда, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 3



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

№№ 1–14 – г. Воронеж; №№ 15–28 – г. Волгоград

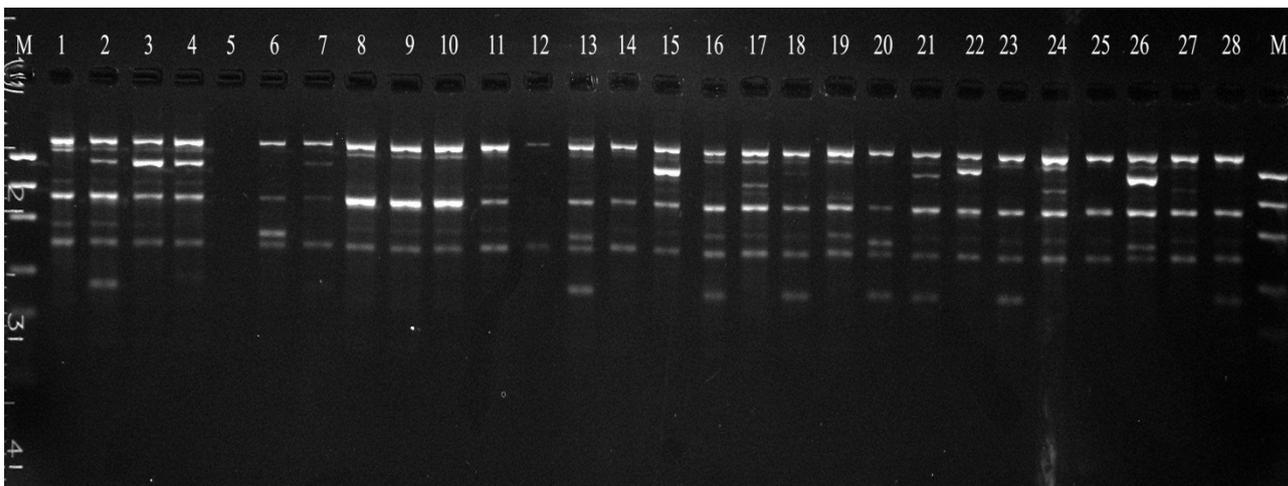
Рис. 9 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы колоновидной и с обычной формой кроны, произрастающего в Семилукском питомнике, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 4



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

1–28 – номер образца

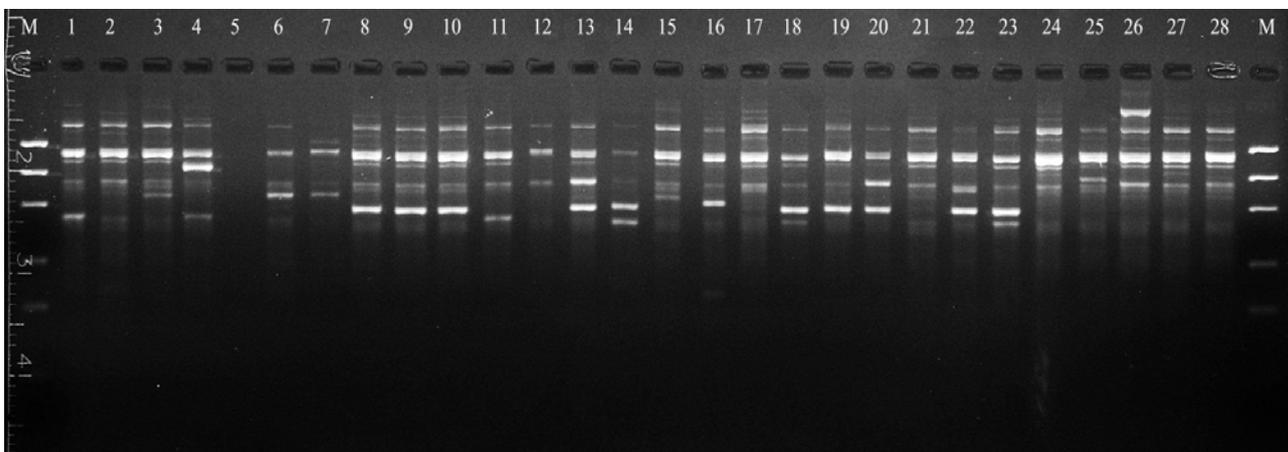
Рис. 10 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающих в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 1



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

1–28 – номер образца

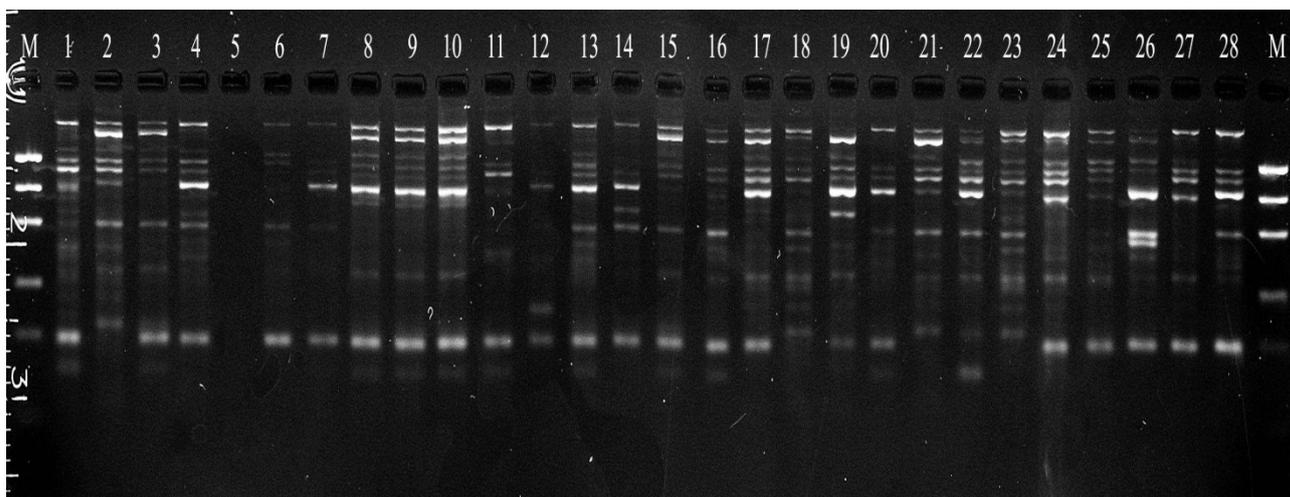
Рис. 11 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающего в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 2



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

1–28 – номер образца

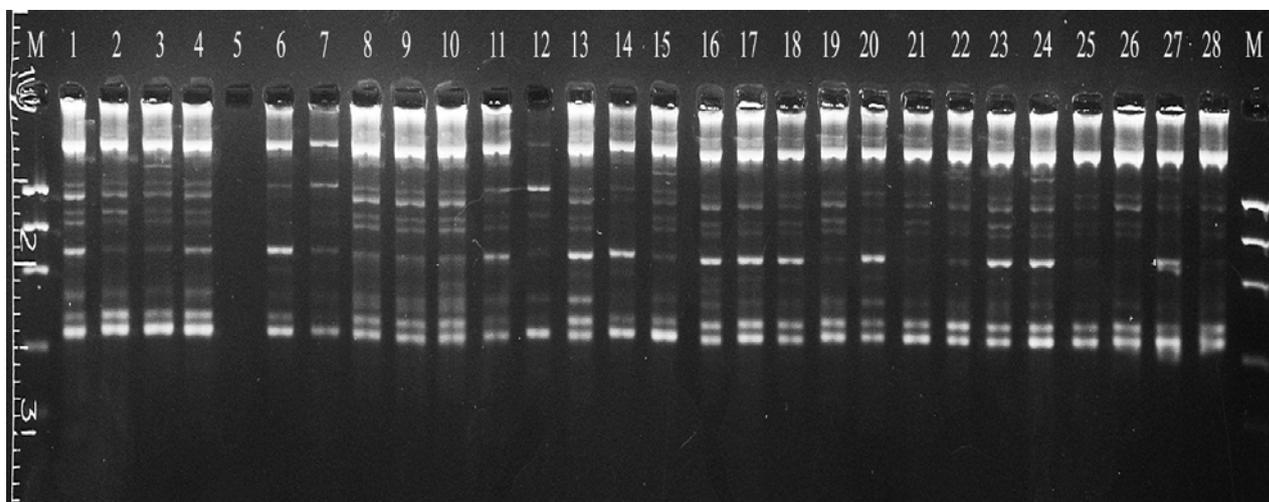
Рис. 12 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающего в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 5



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

1–28 – номер образца

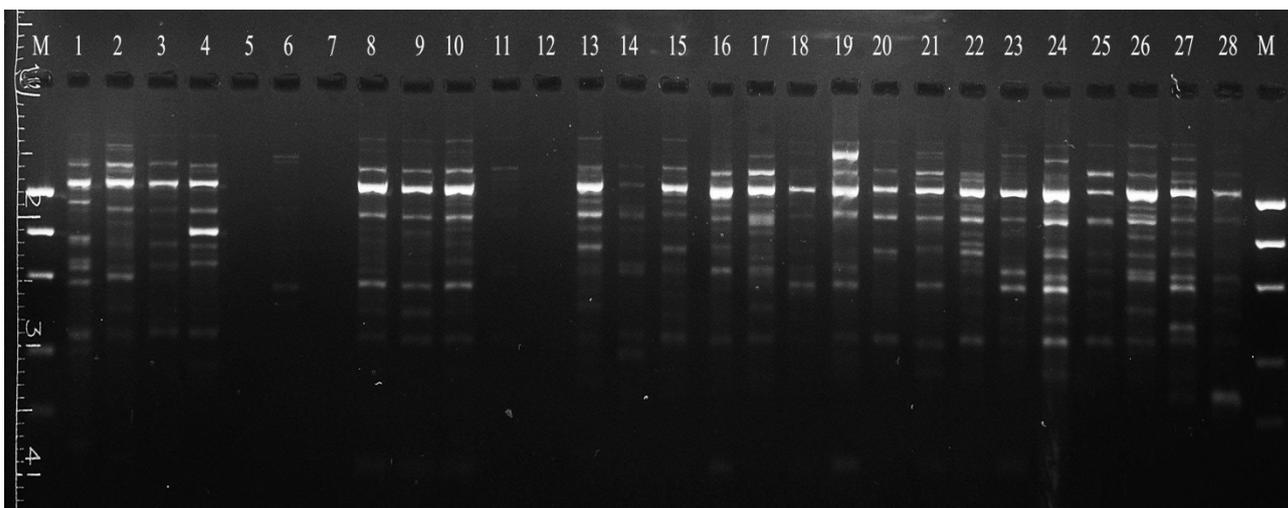
Рис. 13 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающего в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 6



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

1–28 – номер образца

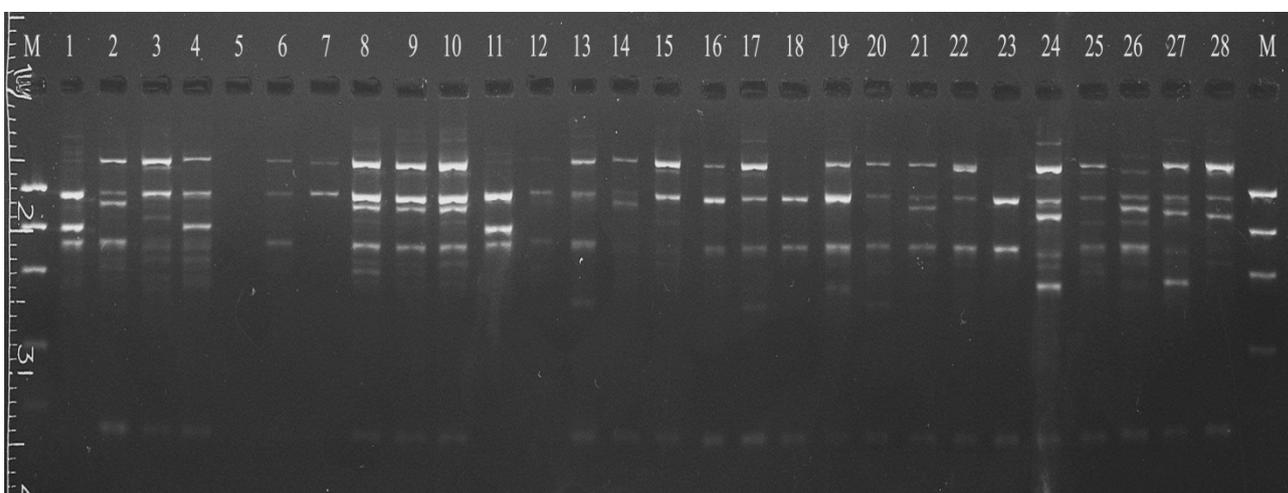
Рис. 14 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающего в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 12



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

1–28 – номер образца

Рис. 15 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающего в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 19



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

1–28 – номер образца

Рис. 16 П– Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого колоновидной формы кроны, произрастающего в г. Волгограде, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 29