

УДК 581.5

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА СУБПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) ПРИ ТЕХНОГЕННОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ

© 2007 Ю.А. Янбаев¹, А.А. Музафарова², А.А. Кулагин², Р.М. Бахтиярова³¹ Сибайский институт Башкирского государственного университета, г. Сибай² Институт биологии Уфимского научного центра РАН,³ Министерство природных ресурсов Республики Башкортостан, г. Уфа

С использованием изоферментов 13 локусов исследована генетическая структура 5 субпопуляций в насаждении сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях промышленного загрязнения на Южном Урале. Установлены относительно высокие различия фрагментов древостоя по параметрам генетического разнообразия. Полученные результаты обсуждены на фоне имеющихся сведений по генетической дифференциации в природных популяциях.

Одним из наиболее опасных последствий промышленного загрязнения лесных экосистем может быть деградация сложившегося в течение длительного времени генофонда древесных растений. Это в последующем может уменьшить их способность к адаптации в изменяющихся условиях среды. В этой связи является актуальным получение всесторонней информации о генетических изменениях в популяциях основных лесообразователей под воздействием промышленного загрязнения.

Целью работы является изучение влияния фрагментации древостоев под влиянием промышленных поллютантов Карабашского медеплавильного завода (Южный Урал) на уровень внутривидовой дифференциации сосны обыкновенной. Вид является наиболее распространенным хвойным лесообразователем исследованного региона. Это один из главных объектов, у которого адаптация к техногенному загрязнению изучена исключительно детально с использованием лесоводственных, морфолого-анатомических, физиологических и биохимических методов [6]. Кроме того, генетическая структура природных ее популяций исследована достаточно подробно [7], что позволяет использовать их в качестве «контроля».

Материалы и методы исследований

Исследованное насаждение (пробная площадь КРБ) расположена примерно в 2,5 км от Карабашского медеплавильного комбината (КМК), который до последнего времени является одним из крупных загрязнителей воздушного бассейна

Южного Урала. Его ежегодные выбросы составляли до последнего времени около 70 тыс. т серы в виде сернистого ангидрида, около 2 тыс. т свинца и больше 1 т мышьяка. По данным санэпидстанции г. Челябинска, концентрация пыли на расстоянии 1-3 км от КМК превышает ПДК в 3-5 раз, сернистого газа - в 6-11 раз, свинца - в 73-186 раз, мышьяка - в 10-16 раз, селена - в 1.5-2 раза. В зоне расположения пробной площади концентрация сернистого ангидрида (SO_2), доминирующего по величине поллютанта, составляет 0.3 мг на 1 м³ воздуха.

Тип леса насаждения - сосняк бруснично-ракетниковый, состав - 10С+Б, полнота - 0,5, класс бонитета - III, средний возраст, высота и диаметр деревьев - 130 лет, 23 м и 32 см соответственно. Высота над уровнем моря составляет 300-400 м. Травяной покров практически отсутствует, из-за чего происходят интенсивные эрозийные процессы. На пробной площади было отобрано и пронумеровано 163 дерева. Они представляют 5 групп или пространственно разделенных фрагментов древостоя (обозначены Крб-1 – Крб-5, с числом деревьев 29, 29, 38, 35 и 32 соответственно) по расположению на рельефе и, следовательно, по степени защищенности от прямого воздействия газообразных выбросов КМК.

В исследованном насаждении деревья были картированы путем угло- и длинномерной съемки и распределены по шкалам [1] жизненного состояния деревьев. Они представляют собой классификацию деревьев по степени изреженности кроны, наличию или отсутствию суховершинности, мертвых и (или) усыхающих ветвей, про-

Таблица. Частоты аллелей выборок фрагментированного насаждения

| Локусы | Аллели | Выборки | | | | | F _{st} |
|---------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|-----------------|
| | | Крб-1 | Крб-2 | Крб-3 | Крб-4 | Крб-5 | |
| Gdh-1 | 2 | 0,207 | 0,431 | 0,365 | 0,314 | 0,250 | 0,031 |
| | 3 | 0,793 | 0,552 | 0,635 | 0,686 | 0,750 | |
| | 4 | 0 | 0,017 | 0 | 0 | 0 | |
| Fdh-1 | 1 | 0 | 0 | 0,013 | 0,014 | 0,016 | 0,010 |
| | 2 | 0,017 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 3 | 0,103 | 0,034 | 0,066 | 0,071 | 0,063 | |
| | 4 | 0,879 | 0,966 | 0,895 | 0,900 | 0,922 | |
| | 5 | 0 | 0 | 0,026 | 0,014 | 0 | |
| Aat-3 | 2 | 0,259 | 0,224 | 0,303 | 0,243 | 0,328 | 0,009 |
| | 3 | 0,017 | 0 | 0 | 0,014 | 0 | |
| | 4 | 0 | 0 | 0,026 | 0,014 | 0,047 | |
| | 5 | 0,707 | 0,759 | 0,671 | 0,729 | 0,625 | |
| | 6 | 0,017 | 0,017 | 0 | 0 | 0 | |
| Aat-2 | 1 | 0,018 | 0,017 | 0,014 | 0,029 | 0 | 0,018 |
| | 2 | 0,089 | 0,017 | 0,041 | 0,071 | 0,141 | |
| | 3 | 0,232 | 0,328 | 0,189 | 0,157 | 0,266 | |
| | 4 | 0,054 | 0 | 0 | 0,057 | 0,016 | |
| | 5 | 0 | 0 | 0,014 | 0 | 0 | |
| | 6 | 0,607 | 0,638 | 0,743 | 0,686 | 0,578 | |
| Aat-1 | 1 | 0 | 0,017 | 0 | 0,014 | 0,047 | 0,016 |
| | 2 | 0,034 | 0,017 | 0,039 | 0,014 | 0,063 | |
| | 3 | 0,966 | 0,966 | 0,961 | 0,971 | 0,891 | |
| 6Pgdh-1 | 1 | 0,138 | 0,017 | 0,053 | 0 | 0 | 0,022 |
| | 2 | 0,586 | 0,621 | 0,500 | 0,700 | 0,656 | |
| | 3 | 0,017 | 0 | 0 | 0,014 | 0 | |
| | 4 | 0,224 | 0,345 | 0,408 | 0,257 | 0,297 | |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0,014 | 0 | |
| | 6 | 0,034 | 0,017 | 0,039 | 0,014 | 0,047 | |
| Lap-1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,016 | 0,015 |
| | 2 | 1,000 | 0,966 | 0,974 | 1,000 | 0,953 | |
| | 3 | 0 | 0,034 | 0,026 | 0 | 0,031 | |
| Lap-2 | 1 | 0,034 | 0 | 0,013 | 0,029 | 0,031 | 0,013 |
| | 2 | 0,914 | 0,879 | 0,961 | 0,929 | 0,953 | |
| | 4 | 0,017 | 0,069 | 0,026 | 0,029 | 0,016 | |
| | 5 | 0,034 | 0,052 | 0 | 0,014 | 0 | |
| | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Mdh-3 | 2 | 0,638 | 0,655 | 0,526 | 0,614 | 0,656 | 0,010 |
| | 3 | 0,362 | 0,345 | 0,474 | 0,386 | 0,344 | |
| Mdh-1 | 1 | 0,034 | 0,017 | 0,079 | 0,029 | 0,016 | 0,016 |
| | 2 | 0,966 | 0,983 | 0,921 | 0,971 | 0,984 | |
| Dia-1 | 1 | 0 | 0,017 | 0,013 | 0,014 | 0 | 0,035 |
| | 2 | 0,569 | 0,759 | 0,750 | 0,586 | 0,750 | |
| | 3 | 0,431 | 0,224 | 0,237 | 0,400 | 0,250 | |
| Aap-1 | 1 | 0 | 0,034 | 0 | 0 | 0,031 | 0,012 |
| | 2 | 0,672 | 0,707 | 0,789 | 0,786 | 0,672 | |
| | 3 | 0,052 | 0,069 | 0,039 | 0,057 | 0,109 | |
| | 4 | 0,224 | 0,190 | 0,132 | 0,129 | 0,172 | |
| | 5 | 0,052 | 0 | 0,039 | 0,029 | 0,016 | |
| Skdh-1 | 1 | 0,017 | 0,017 | 0,092 | 0,029 | 0,047 | 0,016 |
| | 2 | 0,948 | 0,948 | 0,895 | 0,971 | 0,953 | |
| | 3 | 0,034 | 0,034 | 0,013 | 0 | 0 | |

должительности жизни хвои и т.д.

Для характеристики генетической дифференциации выборок использовали в качестве маркеров изоферменты. Разделение их проводили ме-

тодом диск-электрофореза в вертикальных пластинах 7,5%-го полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8,9. Гистохимическое выявление зон ферментативной активности после элек-

трофореа проводили по стандартным методикам [5] с некоторыми нашими модификациями. Использованы изоферменты аспартаминотрансферазы (ААТ, кодовый номер фермента 2.6.1.1), диафоразы (DIA, 1.6.4.3), глутаматдегидрогеназы (GDH, 1.4.1.2), формиатдегидрогеназы (FDH, 1.2.1.2), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-PGD, 1.1.1.44), лейцинаминопептидазы (LAP, 3.4.11.1) и аланинаминопептидазы (AAP, 3.4.11.2), малатдегидрогеназы (MDH, 1.1.1.37). Генетический контроль ферментов был установлен на основе анализа расщепления аллелей гамет в эндоспермах гетерозиготных деревьев [8]. Влияние фрагментации насаждений (возникающих благодаря пространственно неравномерному распределению поллютантов) на их генетическую дифференциацию и пространственное распределение особей и генотипов на мезоуровне исследовали по локусам Aat-1, Aat-2, Aat-3, Gdh-1, Fdh-1, Dia-1, Mdh-1, Mdh-3, Skdh-1, 6Pgdh-1, Lap-1, Lap-2, Aap-1. Статистическую обработку результатов электрофоретических анализов проводили с применением компьютерной программы BIOSYS-1 и с использованием параметров, предоставляемых этим пакетом [10].

Результаты и их обсуждение

Куртины сосен на пробной площади приурочены к защищенным от КМК элементам рельефа, что, видимо, обусловлено долговременным и пространственно неравномерным распределением газообразных поллютантов. По прежним лесоустроительным данным, ранее в выделах, где заложена пробная площадь, были сплошные массивы леса. Установлено, что такое неселективное уменьшение численности популяции далее привело к изменениям в ее структуре. Здоровых деревьев (класс 1) на обследованной территории не обнаружено. Полностью отмершие деревья (класс 5) вырублены лесной службой. Оставшиеся на пробной площади 163 экз. распределились по классам 2, 3 и 4 в соотношении 32,9 : 34,7 : 32,4 %.

Частоты аллелей группы пяти выборок приведены в табл. Из 50 выявленных аллелей 13 полиморфных локусов только 30 являются общими, а 40% аллелей (в основном редких) являются уникальными для одной или нескольких выборок. Но различия деревьев разных фрагментов насаждения выявляются и по общим аллелям, частоты которых изменяются в относительно больших интервалах - в пределах 0,207-0,431 (Gdh-1); 0,189-0,328 (Aat-2); 0,224-0,408 (6Pgdh-

1). Эта закономерность подтверждается и при вычислении полокусных значений параметра подразделенности (табл.). Значения F_{st} в отдельных локусах доходят до 3,5%. Генетическая подразделенность выборок (в среднем $F_{st} = 0,017$) в пределах пробной площади выражена больше, чем дифференциация локальных природных популяций [8].

По однолокусным попарным оценкам расстояния Нея D также получен большой разброс значений этого параметра. В большинстве пар различия небольшие: $D = 0 - 0,010$ (91 случаев), $D = 0,011 - 0,020$ (13), $D = 0,021 - 0,030$ (8). В то же время много примеров, когда пары выборок серьезно дифференцированы: $D = 0,031 - 0,040$ (7 случаев), $D = 0,041 - 0,050$ (2), $D = 0,051 - 0,060$ (6), выше 0,060 (1).

Другой закономерностью, вытекающей из уменьшения численности выборок, являются относительно частые случаи статистически значимых различий наблюдаемых и теоретически ожидаемых распределений генотипов (табл. 2). Всего отмечено 11 случаев нарушения правила Харди-Вайнберга, в том числе 7 – на высоких ($P < 0,001$) уровнях значимости. Использование G -критерия, учитывающего малые ожидаемые численности генотипов, подтвердило реальность нарушений в генетической структуре.

Заключение

Таким образом, благодаря пространственно неравномерному распределению поллютантов, неселективной гибели деревьев и дифференциации по классам жизненного состояния в техногенных условиях в насаждениях сосны обыкновенной усиливается пространственная фрагментация древостоя. В этих условиях из-за уменьшения численности деревьев даже относительно редкие аллели могут изменить генотипическую структуру субпопуляций. У сосны обыкновенной, с ее способностью распространять семена и пыльцу на далекие расстояния, в природных популяциях межвыборочная подразделенность обычно выражена слабо. Убедительно показано, что в природных условиях соотношение внутри- и межпопуляционной частей генного разнообразия остается относительно постоянным на разных уровнях популяционной структуры [2]. Например, для отдельных частей популяций $F_{st} = 0,006$, для локальных популяций одного региона (Южный Урал) $F_{st} = 0,011-0,029$, для групп популяций разных регионов (Южный Урал, северо-запад России) $F_{st} = 0,030$ [8]. Отсюда следует, что

Таблица 2. Статистическая оценка значимости различий наблюдаемых и теоретически ожидаемых распределений генотипов

| Локусы | Вычисленный χ^2 | Число степеней свободы | Уровень значимости |
|--------|----------------------|------------------------|--------------------|
| Крб-1 | | | |
| Fdh-1 | 10,5 | 3 | 0,015 |
| 6Pgd-1 | 29,7 | 10 | 0,001 |
| Dia-1 | 6,5 | 1 | 0,011 |
| Skdh-1 | 14,3 | 3 | 0,002 |
| Крб-2 | | | |
| Mdh-3 | 12,5 | 1 | 0,001 |
| Aap-1 | 15,9 | 6 | 0,014 |
| Skdh-1 | 14,3 | 3 | 0,002 |
| Крб-3 | | | |
| Mdh-3 | 11,6 | 1 | 0,001 |
| Крб-4 | | | |
| Gdh-1 | 6,6 | 1 | 0,010 |
| Крб-5 | | | |
| Mdh-3 | 9,6 | 1 | 0,002 |
| Aap-1 | 26,6 | 10 | 0,003 |

исследованные нами фрагменты насаждения генетически дифференцированы в ранге отдельных локальных популяций. Проведенные нами ранее в этой же популяции сосны обыкновенной исследования показали, что под влиянием промышленного загрязнения нарушается сегрегация аллелей у гетерозигот [3], более чем на один порядок увеличивается частота мутаций и мутациеподобных событий [9], наблюдается преимущественное

выживание генетически более изменчивых деревьев [4]. Усиление внутривидовой дифференциации, различий субпопуляций по разным генетическим параметрам, а также «дисбаланс» генетической структуры (нарушения правила Харди-Вайнберга) могут быть другими следствиями промышленного загрязнения лесных экосистем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.А. Некоторые вопросы диагностики и классификации поврежденных загрязнением лесных экосистем // Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. Л.: Наука, 1990.
2. Алтухов Ю.П. Внутривидовое генетическое разнообразие: мониторинг и принципы сохранения // Генетика. 1995. Т. 31.
3. Бахтиярова Р.М., Янбаев Ю.А. Нарушение сегрегации аллелей гетерозиготных локусов сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения // Генетика. 1994. Т. 30.
4. Бахтиярова Р.М., Янбаев Ю.А. Генетическая изменчивость сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях промышленного загрязнения на Южном Урале. Сравнительное изучение групп деревьев различных категорий жизненного состояния // Генетика. 1996. Т. 32.
5. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977.
6. Кулагин Ю.З. Индустриальная дендрэкология и прогнозирование. М.: Наука, 1985.
7. Янбаев Ю.А., Косарев М.Н., Бахтиярова Р.М. и др. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. Уфа: БГУ, 2000.
8. Янбаев Ю.А., Шуганов З.Х., Бахтиярова Р.М. и др. Использование диск-электрофореза в полиакриламидном геле для установления генетического контроля изоферментов сосны обыкновенной // Материалы междунар. симпоз. «Лесная генетика: охрана, воспроизводство и рациональное использование генетических ресурсов». Уфа: УНЦ РАН, 1994. Ч. 1.
9. Bakhtiyarova R.M., Starova N.V., Yanbayev Yu.A. Genetic changes in populations of Scots Pine growing under industrial air pollution conditions // *Silvae Genetica*. 1995. V.44. № 4.
10. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics // *J. Heredity*. 1981. V. 72.

**GENETIC STRUCTURE OF SCOTSH PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.)
SUBPOPULATIONS UNDER AIR POLLUTION**

© 2007 Yu.A. Yanbaev¹, A.A. Muzafarova², A.A. Kulagin², R.M. Bakhtiyarova³

¹ Sibai institute of Bashkirian State University, Sibai

² Institute of biology, Ufa scientific center of Russian Academy of sciences.

³ Ministry of natural resources of the Republic of Bashkortostan, Ufa

In the Southern Urals, Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) stand under air pollution was studied. Allozyme diversity at 13 loci was determined from five subpopulations. The measures of genetic structure indicate relatively high differentiation of the forest fragments. The results are discussed and compared with those reported for natural populations.