

И. И. Коршиков, А. В. Николаева, Т. А. Иваничко, А. И. Репецкая

Аллозимный полиморфизм можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Vieb.) в Горном Крыму

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Т. М. Черевченко)

Досліджено генетичний поліморфізм за 16 аллозимними локусами чотирьох природних популяцій ялівця високого (*Juniperus excelsa* Vieb.) в Криму. Встановлено високий рівень генетичної мінливості цього виду ($H_E = 0,380$, $H_O = 0,428$) та значну кількість істотних порушень розподілу генотипів від теоретично очікуваного за 3–5 локусами в кожній популяції внаслідок ексцесу гетерозигот.

К специфическому типу растительности в Крыму относятся ксерофитные невысокие редколесья (*Silva rara*) можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Vieb.). В этих редколесьях низкая сомкнутость крон растений, всего 0,2–0,6, и распространены они в Горном Крыму мозаично. Произрастает *J. excelsa* на щебенисто-каменистых крутых склонах нижнего пояса гор до высоты 450–600 м над уровнем моря [1]. В настоящее время уникальные редколесья *J. excelsa* подвержены избыточному антропогенному влиянию, связанному с чрезмерной рекреационной нагрузкой, стихийными вырубками, курортным строительством, локальными пожарами и выпасом скота. Это приводит к существенному сокращению площади можжевеловых лесов Крыма, изменению их внутри- и межпопуляционных связей. Указанные негативные изменения не совпадают с характером и темпами природно-исторического развития *J. excelsa*, с направлением естественного эволюционного процесса, что может привести к значительным потерям генетического разнообразия этого реликтового средиземноморского вида.

Редколесья *J. excelsa* в Горном Крыму — очень интересный объект для популяционно-генетических исследований, которые необходимы для выделения популяций с богатым генофондом и разработки мер по их сохранению. Такие исследования ценны еще тем, что они позволяют выяснить генетическую структуру разреженных популяций вида, где в силу этого и особенностей биологии может быть ограничен свободный обмен генами между растениями, между отдельными субпопуляционными элементами и популяциями в пределах ареала. Для понимания микроэволюционных процессов, адаптации вида к разнообразным экологическим условиям важно знать распределение генетической изменчивости в пределах крымской части ареала *J. excelsa*. В последние годы в разных странах активно проводятся исследования популяционно-генетического разнообразия можжевеловиков с использованием для этого традиционных маркеров — изоферментов [2–6].

Наша цель — анализ аллозимного полиморфизма и генетической структуры популяций *J. excelsa* в Горном Крыму.

Объектами исследований служили генеративно средние (g_2) и старые (g_3) растения четырех популяций *J. excelsa* в Крыму. Три популяции находились на склонах гор побережья Черного моря: мыс Мартыан, мыс Айя (семена собраны до пожара) и Семидворье (10–12 км на восток от Алушты). Четвертая популяция локализована в Васильевской балке в Бахчисарайском районе. Исследуемые выборки из этих популяций насчитывали 27–36 растений, с которых осенью собирали шишкоягоды.

Для определения генотипа растения в качестве молекулярных маркеров использовали изоферменты девяти ферментных систем: глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К. Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназы (GDH, К. Ф. 1.4.1.2), диафоразы (DIA, К. Ф. 1.6.4.3), кислой фосфатазы (ACP, К. Ф. 3.1.3.2), лейцинаминопептидазы (LAP, К. Ф. 3.4.11.1), малатдегидрогеназы (MDH, К. Ф. 1.1.1.37), супероксиддисмутазы (SOD, К. Ф. 1.15.1.1), формиатдегидрогеназы (FDH, К. Ф. 1.2.1.2) и эстеразы (EST, К. Ф. 3.1.1.1). Ранее для этих ферментов *J. excelsa* нами был установлен генетический контроль [7].

Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из восьми и более эндоспермов семян каждого растения, проводили в вертикальных пластинках 7,5%-го полиакриламидного геля с рН 8,9 разделяющего геля в трис-глициновом электродном буфере, рН 8,3 [8]. Для оценки уровня изменчивости определяли частоты аллелей изучаемых локусов в четырех популяциях *J. excelsa*. Подразделенность популяций выясняли, используя показатели *F*-статистик Райта и *G*-статистики Нея, а дифференциацию устанавливали с помощью генетической дистанции Нея [9]. В статистической обработке генетических данных использовали пакет компьютерных программ BIOSYS-1 [10].

При исследовании аллозимного полиморфизма *J. excelsa* возникают трудности из-за того, что в шишкоягодах подавляющего большинства растений из различных популяций Крыма содержится очень малое количество полноценных семян. Вероятно, это связано с самоопылением растений, что приводит к избыточной пустосемянности. У 122 растений четырех популяций *J. excelsa* в результате электрофоретических исследований изоферментов 9 ферментов из эндоспермов семян выявлено 36 аллелей 16 локусов, 14 из которых были полиморфны. Только два локуса — Lar-3 и Dia-2 — были мономорфны. Следует обратить внимание на полиморфизм локусов Sod-2 и Sod-3, изменчивость которых у многих видов семейства Pinaceae Lindl. отсутствует. Из полиморфных локусов 12 отличались высокой изменчивостью, что не совсем характерно, например, для сосны крымской *Pinus pallasiana* D. Don [11] и сосны Станкевича (*P. stankewiczii* (Sukacz) Fomin) [12] в Горном Крыму.

У *J. excelsa* доля полиморфных локусов в среднем составляла 87,5%, а количество аллелей на локус — 2,131 (табл. 1). Высокой была наблюдаемая гетерозиготность растений, которая варьировала по популяциям от 0,377 до 0,465, а в среднем равнялась 0,428. Ожидаемая гетерозиготность была несколько меньшей, хотя тоже высокой. Эти показатели у можжевельника крымского (*J. excelsa*) выше, чем у можжевельника казацкого (*J. sabina* L.) на Южном Урале ($H_E = 0,327 \pm 0,054$, $H_O = 0,323 \pm 0,055$) [3], двух форм можжевельника обыкновенного (*J. communis* L. var *saxatilis* Pall *J.c.* var. *communis* L.) в Сибири ($H_E = 0,190$, $H_O = 0,181$) [2]. У 12 популяций *J. communis* из Голландии ожидаемая гетерозиготность

Таблица 1. Значения основных показателей генетического полиморфизма четырех природных популяций *Juniperus excelsa* в Горном Крыму

Название популяций	Кол-во деревьев	Доля полиморфных локусов	Среднее число аллелей на локус, <i>A</i>	Средняя гетерозиготность		Индекс фиксации Райта, <i>F</i>
				ожидаемая, H_E	наблюдаемая, H_O	
Семидворье	29	0,813	2,000	$0,378 \pm 0,020$	$0,416 \pm 0,020$	-0,100
Васильевская балка	27	0,813	2,063	$0,377 \pm 0,021$	$0,377 \pm 0,020$	0
м. Айя	36	0,813	2,188	$0,369 \pm 0,018$	$0,444 \pm 0,017$	-0,203
м. Мартьян	30	0,875	2,188	$0,372 \pm 0,020$	$0,465 \pm 0,019$	-0,250
Среднее	—	0,875	2,313	$0,380 \pm 0,010$	$0,428 \pm 0,010$	-0,126

(H_E) варьировала от 0,16 до 0,27 [5]. В башкирском Зауралье отмечена высотная генетическая дифференциация *J. sabina*. У подножья горы средняя гетерозиготность выборок *J. sabina* $H_E = 0,404$, $H_O = 0,359$, а на ее вершине в два раза ниже: $H_E = 0,199$, $H_O = 0,188$ [13]. Согласно значениям индекса фиксации Райта в трех из четырех популяций *J. excelsa* выявлен 10–25%-й избыток гетерозигот.

Во всех четырех популяциях *J. excelsa* установлено повышенное число случаев существенного нарушения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди–Вайнберга (табл. 2). Из 14 полиморфных локусов такие случаи выявлены для 9 локусов. В отдельных популяциях значимое нарушение в распределении генотипов отмечено по 3–5 локусам и связано оно с эксцессом гетерозигот. В голландских популяциях *J. communis* отклонения в распределении генотипов по закону Харди–Вайнберга были главным образом связаны с дефицитом гетерозигот [5].

Средние значения коэффициентов инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}) и инбридинга особи относительно вида в целом (F_{IT}) свидетельствуют о том, что для крымских популяций *J. excelsa* характерен избыток гетерозигот — 8,4–10,5% (табл. 3). При значительной географической изолированности исследуемые популяции слабо подразделены. Параметры F_{ST} и G_{ST} , определяющие подразделенность, показывают, что 98% всей генетической изменчивости находится внутри популяций. Невысокой подразделенностью отличались и голландские популяции *J. communis* ($F_{ST} = 0,026$), для них характерен явный эксцесс гомозигот ($F_{IS} = 0,174$) [5]. Только по 3,4% генетической изменчивости приходилось на межпопуляционную у двух сибирских форм *J. communis*, для них был свойствен небольшой избыток гомозигот — 2,6% [2].

Исследуемые популяции *J. excelsa*, согласно значениям генетической дистанции Нея (D_N) (табл. 4), имеют уровень генетической дифференциации такой, как и другие виды хвойных в Крыму [11, 12].

Таким образом, результаты наших исследований подтверждают высокий уровень генетического разнообразия можжевельников. У крымских популяций он значительно выше средних значений, полученных для 42 видов хвойных ($H_O = 0,152 \pm 0,043$, $H_E = 0,145 \pm 0,016$, $P_{99} = 62,5 \pm 5,7\%$, $A = 2,08 \pm 0,14$) [14] и в целом для голосемянных ($H_E = 0,145 \pm 0,016$, $P_{99} = 62,5 \pm 5,7\%$, $A = 2,08 \pm 0,14$) [15]. На примере *J. excelsa* мы сталкиваемся, по всей видимости, с тем фактом, что высокая гетерозиготность, будучи выгодной для адаптации особи, неблагоприятна для ее потомства, что и приводит к образованию значительного

Таблица 2. Случаи существенного нарушения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди–Вайнберга в четырех популяциях *Juniperus excelsa* Горного Крыма

Локус	Алушта	Васильевская балка	м. Айя	м. Мартьян
Got-2	6,58(1)*	12,72(3)**	4,00(1)*	n. s.
Lap-1	7,85(3)*	n. s.	n. s.	15,97(3)**
Asp-1	7,96(3)*	12,27(3)**	n. s.	n. s.
Asp-2	n. s.	7,84(3)*	n. s.	8,71(3)*
Asp-3	n. s.	n. s.	n. s.	8,70(3)*
Fdh	7,62(1)**	n. s.	n. s.	n. s.
Sod-2	8,26(1)**	10,06(1)**	n. s.	n. s.
Mdh-2	n. s.	5,20(1)*	11,90(1)***	10,06(1)**
Mdh-3	n. s.	n. s.	11,90(1)***	4,61(1)*

Примечание. В скобках указано количество степеней свободы. Достоверные отличия при: * $P < 0,95$; ** $P < 0,99$; *** $P < 0,999$.

Таблица 3. Значения показателей F -статистик Райта и G -статистики Нея для четырех природных популяций *Juniperus excelsa* Горного Крыма

Локус	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
Gdh	0,000	0,006	0,006	0,006
Got-1	-0,330	-0,299	0,023	0,013
Mdh-2	-0,485	-0,478	0,004	0,004
Mdh-3	-0,229	-0,219	0,008	0,008
Асп-1	-0,055	-0,037	0,017	0,018
Асп-2	-0,144	-0,130	0,012	0,011
Асп-3	-0,182	-0,160	0,018	0,020
Lap-1	-0,082	-0,050	0,030	0,027
Lap-3	0,000	0,000	0,000	0,000
Fdh	0,078	0,088	0,011	0,011
Sod-1	0,024	0,047	0,023	0,023
Sod-2	-0,211	-0,204	0,005	0,005
Sod-3	-0,068	-0,046	0,020	0,025
Est	0,099	0,217	0,131	0,131
Dia-1	-0,102	-0,075	0,025	0,025
Dia-2	0,000	0,000	0,000	0,000
Среднее	-0,105	-0,084	0,021	0,020

Таблица 4. Генетические дистанции Нея (D_N) для четырех природных популяций *Juniperus excelsa* Горного Крыма

Популяции	Семидворье	Васильевская балка	м. Айя	м. Мартьян
Семидворье	0,000	0,010	0,011	0,016
Васильевская балка	0,010	0,000	0,006	0,018
м. Айя	0,011	0,006	0,000	0,020
м. Мартьян	0,016	0,018	0,020	0,000

количества неполноценных семян. Для полноценного выделения популяций *J. excelsa* как объектов сохранения генофонда *in situ* необходимы более детальные популяционно-генетические исследования по всему ареалу в Крыму. Однако очевидно и другое: в условиях возросшей антропогенной нагрузки все популяции *J. excelsa* нуждаются в охране, также необходим искусственный отбор отдельных наиболее ценных образцов для создания коллекций клонов *ex situ*.

1. Дидух Я. П. Растительный покров Горного Крыма // Ботан. журн. – 1990. – **75**, № 3. – С. 336–346.
2. Хантемирова Е. В., Семериков В. Л. Аллозимный полиморфизм разновидностей можжевельника обыкновенного // Лесоведение. – 2009. – № 1. – С. 74–79.
3. Янбаев Ю. А., Редькина Н. Н., Муллагулов Р. Ю. Аллозимная изменчивость можжевельника казахского *Juniperus sabina* L. на Южном Урале // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – **24**, № 2–3. – С. 325–328.
4. Man Kyu Huh, Hong Wook Huh. Genetic diversity and population structure of *Juniperus rigida* (Cupressaceae) and *Juniperus coreana* // Evolutionary Ecology. – 2000. – **14**. – P. 87–98.
5. Gerard J., Oostermeijer B., De Knegt B. Genetic population structure of the wind-pollinated, dioecious shrub *Juniperus communis* in fragmented Dutch heathlands // Plant Species Biology. – 2004. – **19**. – P. 175–184.
6. Редькина Н. Н. Оптимизация сохранения биологического разнообразия лекарственных растений на популяционной основе: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Оренбург, 2008. – 33 с.
7. Коршиков И. И., Николаева А. В. Генетический контроль аллозимов у можжевельника высокого (*Juniperus excelsa* Vieb.) в Крыму // Цитология и генетика. – 2007. – **41**, № 4. – С. 15–19.

8. *Davis B. J.* Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1964. – No 121. – P. 404–427.
9. *Nei M.* Genetic distance between populations // *Amer. Naturalist.* – 1972. – No 106. – P. 283–292.
10. *Swofford D. L., Selander R. B.* BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // *J. Hered.* – 1981. – **72**, No 4. – P. 281–283.
11. *Коршиков И. И., Терлыга Н. С., Бычков С. А.* Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской). – Донецк: ООО “Лебедь”, 2002. – 328 с.
12. *Коршиков И. И., Горлова Е. М.* Генетическая структура, подразделенность и дифференциация популяций сосны Станкевича (*Pinus stankewiczii* (Sukacz.) Fomin) в Горном Крыму // *Генетика.* – 2006. – **42**, № 6. – С. 824–832.
13. *Муллагулова Э. Р., Редькина Н. Н., Муллагулов Р. Ю.* Генетическая дифференциация разновысотных выборок можжевельника казацкого // *Материалы всерос. науч.-практич. конф. “Проблемы и перспективы развития инновационной деятельности в агропромышленном производстве”.* Ч. III. Рациональное использование и охрана земельных, лесных и водных ресурсов, 26 февр. – 1 марта 2007 г. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2007. – С. 216–218.
14. *Крутовский К. В., Политов Д. В., Алтухов Ю. П. и др.* Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны (*Pinus sibirica* Du Tour). Сообщ. IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // *Генетика.* – 1989. – **25**, № 11. – С. 2009–2032.
15. *Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L.* Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species // *New Forests.* – 1992. – **6**. – P. 95–124.

Донецкий ботанический сад НАН Украины
 Ботанический сад Таврического национального
 университета им. В. И. Вернадского, Симферополь

Поступило в редакцию 04.06.2009

I. I. Korshikov, A. V. Nikolaeva, T. A. Ivanichko, A. I. Repetskaia

Allozyme polymorphism of the juniper tall (*Juniperus excelsa* Bieb.) in the Mountainous Crimea

*Researches of the genetical polymorphism on 16 allozymous loci have been carried out in four natural populations of the juniper tall (*Juniperus excelsa* Bieb.) from the Crimea. A high level of genetical variability of this species ($H_E = 0.380$, $H_O = 0.428$) is established. A significant amount of essential disturbances of the allocation of genotypes from the theoretically expected one on 3–5 loci in each population owing to an excess of heterozygotes is revealed.*