

О.А. Мудрик¹, С.М. Приваліхін¹, Н.М. Пірко², Д.В. Політов³

ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ МАТЕРИНСЬКИХ ДЕРЕВ ТА ЗАРОДКІВ ЇХ НАСІННЯ У РІЗНОВИСОТНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *PICEA ABIES* (L.) KARST. В УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТАХ

зародки насіння, генетична структура, генетична диференціація, ізоферментні локуси, *Picea abies*, Українські Карпати

На заповідних територіях Українських Карпат зберігаються залишки пралісів хвойних, які можна використовувати для вивчення процесів підтримання генетичної різноманітності популяцій у їх насінневому потомстві, зокрема ялини європейської (*Picea abies* (L.) Karst.), яка є головною лісоутворюючою породою Українських Карпат [15]. Попередні популяційно-генетичні дослідження *P. abies* в Україні присвячені встановленню генетичного контролю, вивченню диференціації і підрозділеності популяцій ялини європейської у цій частині її ареалу [2, 6, 13, 14]. Дослідження особливостей успадкування генетичної структури, що відбуваються у стані норми в популяціях на заповідних територіях, дозволять оцінювати зміни видового генофонду під дією антропогенного впливу, у тому числі штучному відтворенні [3].

Мета роботи – дослідження генетичної мінливості дерев і зародків їх насіння у низинній і висотній популяціях *P. abies* в Українських Карпатах.

Основними завданнями роботи є вивчення генетичної структури материнських рослин *P. abies* та зародків їх насіння за 7 алозимними локусами та оцінка ступеню відтворення генетичної різноманітності в двох популяціях у різних екологічних умовах Українських Карпат.

Об'єктами досліджень були дві природні популяції *P. abies* Українських Карпат. Насіння з дерев віком 80-150 років було зібране у 2002-2003 рр. під час самостійних експедицій в Івано-Франківській області: в Карпатському національному парку (популяція БД, 700 м над рівнем моря (над р.м.)) і заповіднику “Горгани” (БВ, 1400 м над р.м.). У цих популяціях було проаналізовано 60 дерев (по 30 у кожній). Вибірки зародків насіння склали 178 і 174 у популяціях БД і БВ відповідно.

Для визначення генотипу дерев та зародків їх насіння використовували метод електрофоретичного розділення ізоферментів гаплоїдних ендоспермів та диплоїдних зародків насіння одночасно на сусідніх доріжках 13%-го крохмального гелю. В якості генетичних маркерів використовували ізоферменти 3 ген-ферментних систем: плутаматдегідрогенази (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), малатдегідрогенази (MDH, К.Ф. 1.1.1.37) і 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6-PGD, К.Ф. 1.1.1.44) [9]. Електрофорез ізоферментів проводили у морфолін-цитратній буферній системі з рН 7,8 [16], гелеві пластинки гістохімічно забарвлювали за загальноприйнятими методиками [2, 17]. Для встановлення гаплотипів батьківських гамет “віднімали” материнські алелі з генотипів зародків [11]. Для кожної рослини аналізували 6 випадково обраних насінин з різних жіночих шишок. Алелям, що було ідентифіковано, надавали порядкові номери 1, 2 і т.д. та позначали у надстрочнику: наприклад, Gdh¹, Gdh²[1].

Для оцінки рівня генетичної мінливості дерев і зародків їх насіння використовували типові для популяційної генетики методи та показники [1, 2]. Для аналізу генетичної диференціації популяцій використовували F-статистики Райта [20] та G-статистику Нея [18]. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми BIOSYS-1 [19]. Алельну та генотипічну гетерогенність вибірок материнських рослин та зародків

насіння, а також гетерогенність алелів материнських та батьківських гамет оцінювали, використовуючи стандартний χ^2 -тест [4].

Всього в двох популяціях *P. abies* встановлено 17 алелів материнських рослин та зародків їх насіння, спільними з них було 13 (табл. 1). І низинній, і висотній популяціям властиво по два рідкісних алеля, зафіксованих у вибірках дерев і зародків насіння за різними локусами: в популяції БД це алелі Mdh-3¹ та 6-Pgd-2⁷, БВ – Mdh-1² і 6-Pgd-3³. В обох вибірках материнських рослин з різновисотних популяцій встановлено практично однакову кількість генотипів – 19 і 17 відповідно у низинній та висотній, і однакову – у вибірках зародків насіння (21). Загальними у вибірках дерев було 15 генотипів, у вибірках зародків – 18.

Таблиця 1. Частоти алелів материнських рослин, зародків їх насіння, батьківських та материнських гамет, значення гетерозиготності у низинній і висотній популяціях *Picea abies* Українських Карпат

Локус	Алель	БД				БВ			
		Мр	Зн	Бг	Мг	Мр	Зн	Бг	Мг
Gdh	1	0,983	0,969	0,952	0,983	0,933	0,963	0,956	0,967
	2	0,017	0,031	0,048	0,017	0,067	0,037	0,044	0,033
	H _O	0,033	0,028	–	–	0,067	0,075	–	–
	H _E	0,033	0,060	–	–	0,125	0,071	–	–
Mdh1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	0,983	0,986	1,000	0,971
	2	0	0	0	0	0,017	0,014	0	0,029
	H _O	0	0	–	–	0,033	0,029	–	–
	H _E	0	0	–	–	0,033	0,028	–	–
Mdh2	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	H _O	0	0	–	–	0	0	–	–
	H _E	0	0	–	–	0	0	–	–
Mdh3	1	0,017	0,006	0	0,017	0	0	0	0
	2	0,033	0,037	0,055	0,033	0,200	0,078	0,077	0,100
	3	0,950	0,957	0,945	0,950	0,800	0,922	0,923	0,900
	H _O	0,100	0,067	–	–	0,200	0,138	–	–
	H _E	0,096	0,083	–	–	0,320	0,144	–	–
Mdhm	1	0,917	0,952	0,992	0,917	0,983	0,991	1,000	0,983
	2	0,083	0,048	0,008	0,083	0,017	0,009	0	0,017
	H _O	0,167	0,090	–	–	0,033	0,017	–	–
	H _E	0,152	0,091	–	–	0,033	0,018	–	–
6Pgd2	4	0,483	0,419	0,420	0,483	0,500	0,520	0,522	0,500
	5	0,100	0,087	0,011	0,100	0,017	0,026	0,037	0,017
	6	0,400	0,491	0,509	0,400	0,483	0,454	0,441	0,483
	7	0,017	0,003	0	0,017	0	0	0	0
	H _O	0,733	0,410	–	–	0,533	0,414	–	–
	H _E	0,596	0,576	–	–	0,516	0,523	–	–
6Pgd3	2	0,667	0,646	0,641	0,667	0,633	0,635	0,631	0,650
	3	0	0	0	0	0,017	0,023	0	0,017
	5	0,333	0,354	0,359	0,333	0,350	0,342	0,369	0,333
	H _O	0,400	0,354	–	–	0,533	0,362	–	–
	H _E	0,444	0,457	–	–	0,477	0,479	–	–

Примітка. Тут і далі у таблицях: БД – низинна, БВ – висотна популяції; Мр – материнські рослини, Зн – зародки їх насіння, Бг – батьківські гамети, Мг – материнські гамети; H_E – очікувана, H_O – наявна гетерозиготність; знаком «–» позначено відсутність гетерозиготності у гаплоїдних клітин.

Гетерогенність алелів і генотипів дерев у досліджуваних популяціях відсутня (табл. 2). Частоти алелів вибірок зародків насіння достовірно гетерогенні за 5 з 6 поліморфних локусів, частоти генотипів – за 4. Частоти алелів пулу батьківських гамет практично однакові в обох популяціях (за виключенням локусу 6-Pgd-2), а пулу материнських гамет – достовірно неоднорідні за більшістю поліморфних локусів – за 4 з 6. Таким чином, дорослі дерева низинної та висотної популяцій *P. abies* в Українських Карпатах практично не відрізняються за своєю алельною та генотипічною структурою, а генетична неоднорідність їх насінневого потомства обумовлена не випадковим внеском чоловічих гамет при запиленні, а генетичними особливостями пулу жіночих гамет, сформованих материнськими рослинами у рік наших досліджень.

Таблиця 2. Міжпопуляційна гетерогенність частот алелів і генотипів материнських рослин і зародків їх насіння різновисотних популяцій *Picea abies* в Українських Карпатах

Локус	Мр		Зн			
	А	Г	А	Г	Бг	Мг
Gdh	n.s.	n.s.	n.s.	6,83*(1)	n.s.	n.s.
Mdh1	n.s.	n.s.	5,02*(1)	5,05*(1)	n.s.	5,24*(1)
Mdh3	n.s.	n.s.	7,48*(2)	n.s.	n.s.	9,17*(2)
Mdhm	n.s.	n.s.	9,59**(1)	9,19***(1)	n.s.	8,01**(1)
6Pgd2	n.s.	n.s.	16,90***(3)	16,19*(6)	7,29*(2)	14,66**(3)
6Pgd3	n.s.	n.s.	8,29*(2)	n.s.	n.s.	n.s.

Примітка. А – алелі, Г – генотипи; різниця достовірна при * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, у дужках наведені числа ступенів свободи, n.s. – різниця несуттєва.

Оцінка внутрішньовибіркової гетерогенності частот алелів і генотипів довела, що у межах кожної з досліджуваних популяцій у насінневому потомстві підтримується алельна та генотипічна різноманітність, яка властива материнським рослинам. Відмічено лише поодинокі достовірні випадки генетичної неоднорідності алелів та генотипів дорослих дерев і зародків, а також частот алелів батьківських та материнських гамет.

У материнських рослин *P. abies* в Українських Карпатах від нижнього до верхнього висотного поясу збільшується частка поліморфних локусів (табл. 3). У вибірках зародків насіння різновисотних популяцій поліморфність однакова. Середнє число алелів на локус у вибірках зародків нижче, ніж у вибірках дерев обох популяцій. Вибіркам зародків характерний достовірно менший рівень наявної гетерозиготності при порівнянні з материнськими деревами. Це явище поширене серед популяцій видів родини Pinaceae Lindl.: на ранніх онтогенетичних стадіях рослин, як правило, спостерігають нестачу гетерозиготних та ексцес гомозиготних генотипів внаслідок інбридингу [5, 8, 10, 12]. Ексцес гомозигот згодом елімінується під впливом природного добору, що призводить до невеликого ексцесу гетерозигот у генеративній частині популяції, однак в деяких популяціях суттєвий дефіцит гетерозигот спостерігають також у рослин репродуктивного віку [3, 12]. У нашому дослідженні у материнських дерев низинної популяції спостерігається невеликий надлишок (8,4 %), висотної – невелика нестача (7 %), а у вибірках зародків – 24,9 та 17,8 % дефіцит гетерозигот відповідно (див. табл. 3). Аналіз розподілу генотипів довів, що генеративні дерева обох популяцій знаходяться у рівноважному генотипічному стані за Харді-Вайнбергом, а у вибірках зародків насіння встановлено достовірні випадки відхилення від рівноваги за рахунок надлишку гомозигот.

Таблиця 3. Значення основних показників генетичного поліморфізму материнських рослин та зародків насіння різновисотних популяцій *Picea abies* в Українських Карпатах

Вибірка	Обсяг вибірки, шт.	Частка поліморфних локусів (P ₉₉)	Середнє число алелів на локус (A)	Середня гетерозиготність		Індекс фіксації Райта (F)
				очікувана (H _E)	наявна (H _O)	
БД Мр	30	0,714	2,143	0,189±0,022	0,205±0,022	-0,084
БД Зн	178	0,714	1,857	0,181±0,009	0,136±0,009	0,249
БВ Мр	30	0,857	2,143	0,215±0,025	0,200±0,023	0,070
БВ Зн	174	0,714	2,000	0,180±0,009	0,148±0,009	0,178

Незважаючи на значну відстань між досліджуваними нами популяціями за висотним градієнтом, вони мало диференційовані між собою: середні значення показників F_{ST}/G_{ST} між популяціями склали 0,015 та 0,016 відповідно (табл. 4). Це свідчить на користь того, що близько 99 % генетичної диференціації дорослих рослин припадає на внутрішньо-, і лише близько 1 % - на міжпопуляційну її складову. Вибірки зародків насіння обох популяцій *P. abies* підрозділені ще менш, ніж материнські рослини: середні значення F_{ST}/G_{ST} між ними були 0,005 та свідчили, що внутрішньопопуляційна мінливість вибірок зародків складає 0,5 %, а міжпопуляційна - 99,5 %. Нижча генетична диференціація насінневого потомства порівняно з дорослими рослинами також спостерігається у популяціях інших видів хвойних [3, 7]. Дослідження 23 популяцій *P. abies* у Східній Європі встановили низьку міжпопуляційну диференціацію (3,2 %), властиву всьому роду *Picea* L. [2]. Це пов'язують з інтенсивним потоком генів між популяціями, який здійснюється як пилком, так і насінням. Необхідно зазначити, що між материнськими рослинами та зародками їх насіння в межах обох досліджуваних

Таблиця 4. Значення показників міжвибіркової диференціації F_{ST}/G_{ST} між низинною та висотною популяціями *Picea abies* в Українських Карпатах та між материнськими рослинами та їх зародками насіння в межах кожної популяції

Локус	БД – БВ				БД		БВ	
	Мр		Зн		Мр – Зн		Мр – Зн	
	F _{ST}	G _{ST}	F _{ST}	G _{ST}	F _{ST}	G _{ST}	F _{ST}	G _{ST}
Gdh	0,016	0,016	0	0	0,001	0	0,003	0,003
Mdh1	0,009	0,009	0,007	0,007	0	0	0	0
Mdh3	0,043	0,057	0,005	0,006	0,001	0	0,022	0,022
Mdhm	0,023	0,023	0,014	0,014	0,003	0,003	0,001	0
6Pgd2	0,012	0,006	0,008	0,007	0,003	0,003	0	0
6Pgd3	0,003	0,001	0,004	0	0	0	0	0
середнє	0,015	0,016	0,005	0,005	0,001	0,001	0,004	0,003

нами популяцій *P. abies* генетична диференціація мінімальна (див. табл. 4), що ще раз свідчить на користь їх генетичної близькості та повного відтворення генетичної структури дорослих рослин у насінневому потомстві.

Таким чином, аельна структура дерев різновисотних популяцій *P. abies* повністю відтворюється у їх насінневому потомстві, а генотипічна структура відхилена від рівноважного стану через ексцес гомозиготних генотипів. Близькість усіх показників генетичної мінливості вибірок дерев і зародків насіння обох популяцій *P. abies* в Українських Карпатах свідчить про близькість їх генетичної структури та характеру її успадкування, незважаючи на віддаленість цих популяцій у висотному градієнті. Можливо, це пов'язано з широкою еколого-ценотичною амплітудою та здатністю обміну генетичною інформацією популяцій *P. abies* на велику відстань.

Робота виконана в рамках проекту науково-дослідних робіт молодих учених НАН України “Аналіз підтримання генетичної структури природних популяцій ялини європейської (*Picea abies* (L.) Karst.) у насінневому потомстві в Українських Карпатах” (№ ДР 0105U008150). Також робота частково підтримана Програмою фундаментальних досліджень Відділення біологічних наук Російської академії наук „Биологические ресурсы России: фундаментальные основы рационального использования”. Автори висловлюють глибоку подяку керівництву та співробітникам природного заповідника “Горгани” та національного природного парку “Карпатський” за допомогу при зборі насінневого матеріалу ялини європейської.

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 232 с.
2. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. – 197 с.
3. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
4. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. – 271 с.
5. Коршиков И.И., Мудрик Е.А. Генетическая гетерогенность урожая семян разных лет в природной популяции сосны крымской // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / За ред. М.В. Роїка. – К.: КВЦ, 2004. – С.234–238.
6. Коршиков И.И., Привалихин С.Н., Горлова Е.М., Пирко Я.В. Высотная дифференциация горных популяций видов семейства Pinaceae в Украинских Карпатах и Крыму // Ботан. журн. – 2005. – 90, № 9. – С. 1412–1420.
7. Крутовский К.В., Политов Д.В., Алтухов Ю.П. и др. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны (*Pinus sibirica* Du Tour). Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // Генетика. – 1989. – 25, № 11. – С. 2009–2032.
8. Мудрик Е.А., Горлова Е.М. Генетическая гетерогенность семенного потомства природной популяции сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) // Промышленная ботаника. – 2003. – Вып. 3. – С. 91–94.
9. Номенклатура ферментов. – М.: ВИНТИ, 1979. – 320 с.
10. Пирко Н.М. Популяційно-генетична мінливість ялиці білої (*Abies alba* Mill.) в Українських Карпатах: Автореф. дис. ...канд. біол. наук: 03.00.15. – Київ, 2005. – 20 с.
11. Политов Д.В., Крутовский К.В. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение V. Анализ системы скрещивания // Генетика. – 1990. – 26, № 11. – С. 2002–2011.
12. Политов Д.В., Крутовский К.В., Алтухов Ю.П. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов // Генетика. – 1992. – 28, №1. – С. 93–114.
13. Привалихин С.Н. Наследование изоферментов четырех дегидрогеназ у ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) // Промышленная ботаника. – 2004. – Вып. 4. – С. 201–205.
14. Привалихин С.Н., Коршиков И.И., Пирко Н.Н., Великоридько Т.И., Пирко Я.В. Генетический контроль изоферментов ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из Украинских Карпат // Цитология и генетика. – 2006. – № 2. – С. 20–26.
15. Смаглюк К.К. Аборигенні хвойні лісоутворювачі. – Ужгород: Карпати, 1972. – 112 с.
16. Clayton J.W., Tretiak D.N. Amino-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis // Journal of Fisheries Research Board Canada. – 1972. – 29. – P. 1169–1172.
17. Conkle M.T., Hodgskiss P.D., Nunnally L.B., Hunter S.C. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. – USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep., PSW-64, 1982. – 18 p.

18. Nei M. Molecular population genetics and evolution. – New York: Amer. Elsev. Publ. Comp., Inc., 1975. – 278 p.
19. 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, № 4. – P. 281–283.
20. Wright S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. – 1969. – 2. – P. 395–420.

¹Донецький ботанічний сад НАН України

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України

³Інститут загальної генетики ім. М.І. Вавилова РАН

Надійшла 13.04.2006

УДК 575.1:582.475.2 (477.8)

ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ МАТЕРИНСЬКИХ ДЕРЕВ ТА ЗАРОДКІВ ЇХ НАСІННЯ У РІЗНОВИСОТНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *PICEA ABIES* (L.) KARST. В УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТАХ

О.А. Мудрик¹, С.М. Приваліхін¹, Н.М. Пірко², Д.В. Політов³

¹Донецький ботанічний сад Національної академії наук України

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України

³Інститут загальної генетики ім. М.І. Вавилова РАН

На основі аналізу 7 алозимних локусів материнських рослин і зародків їх насіння *Picea abies* встановлено, що генетична різноманітність двох різновисотних популяцій відтворюється у їх насінневному потомстві. Між вибірками дерев та зародків насіння обох популяцій виявлено незначну генетичну диференціацію, зовсім низькою вона була між материнськими рослинами та зародками насіння в межах кожної популяції. Висотна і низинна популяції *P. abies* в Українських Карпатах мають подібну генетичну структуру і характер її успадкування, незважаючи на віддаленість цих популяцій у висотному градієнті.

UDC 575.1:582.475.2 (477.8)

GENETIC VARIATION OF MATERNAL TREES AND THEIR SEED EMBRYOS IN THE *PICEA ABIES* (L.) KARST. POPULATIONS OF VARIOUS HEIGHT IN THE UKRAINIAN CARPATHIANS

O.A. Mudrik¹, S.M. Privalikhin¹, N.M. Pirko², D.V. Politov³

¹Donetsk Botanical Gardens, Nat. Acad. Sci. of Ukraine

²Institute of cell biology and genetic engineering, Nat. Acad. Sci. of Ukraine

³N.I.Vavilov Institute of General Genetics, RAS

On the basis of analysis of 7 allozymous loci of *Picea abies* maternal plants and their seed embryos, it is determined that genetic diversity of two populations of various height maintains in their seed progenies. Insignificant genetic differentiation between tree samples and seed embryos of both populations is found. Genetic differentiation between maternal plants and seed embryos within every population was totally low. Height-altitude and low-laying *Picea abies* populations in the Ukrainian Carpathians have similar genetic structure and peculiarities of its inheriting despite difference in height of the populations.