

А.Е. Демкович

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ И ИХ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

сосна обыкновенная, плюсовые деревья, зародыши семян, генетическая изменчивость.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является поливалентным широкоареальным видом. Благодаря высокой устойчивости к природно-климатическим факторам и неприхотливости к почвенным условиям *P. sylvestris* широко используется для создания лесонасаждений в степной и лесостепной зонах. Так, например, в юго-восточной части Украины она является основной лесной культурой. Для повышения устойчивости и продуктивности насаждений *P. sylvestris* проводится плюсовая селекция – отбор в популяциях и уже имеющихся насаждениях наиболее развитых деревьев. Эти деревья планируется использовать для создания клоновых плантаций с целью получения генетически улучшенных семян. Однако есть опасения, что в семенном потомстве плюсовых деревьев не в полной мере будет воспроизводиться их генетическое разнообразие из-за возможного инбридинга. Известно, что инбредная депрессия является одной из причин низкой семенной продуктивности деревьев, снижения посевного качества семян, генетических свойств потомства. В этой связи у многих лесных пород изучается система скрещивания, проводятся исследования частоты самоопыления в потомстве плюсовых деревьев [12]. Анализ особенностей наследования генетической структуры, изучение процессов поддержания генетического разнообразия насаждений в их семенном потомстве можно эффективно провести на основе исследований аллозимной изменчивости [5].

Цель работы – оценить характер и степень воспроизводства генетической структуры хозяйственно ценных плюсовых деревьев *P. sylvestris* в их семенном потомстве. Для этого по 20 аллозимным локусам изучали генетическую структуру материнских деревьев, их потомства – зародышей семян и пула пыльцы, воспринятого материнскими растениями. Объектами исследований служили 34 клона различных плюсовых деревьев *P. sylvestris* ранее выделенных из природных популяций в Изюмском и Змиевском лесничествах Харьковской области. Источником материала для генетического анализа стала архивно-клоновая плантация плюсовых деревьев, заложенная Украинским научно-исследовательским институтом лесного хозяйства и агролесомелиорации им Г. Н. Высоцкого. В качестве молекулярно-генетических маркеров применяли изоферменты: глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К.Ф. 2.6.1.1), диафоразы (DIA, К.Ф. 1.6.4.3), алкогольдегидрогеназы (ADH, К.Ф. 1.1.1.1), глутаматдегидрогеназы (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), формиатдегидрогеназы (FDH, К.Ф. 1.2.1.2), 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) и супероксиддисмутазы (SOD, К.Ф. 1.15.1.1). Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из эндоспермов и зародышей семян, проводили в вертикальных пластинках 7,5 %-го полиакриламидного геля в трис-глициновом электродном буфере (рН 8,3) [4]. Гистохимическое окрашивание зон ферментной активности на гелевых пластинках выполняли по общепринятым методикам [13] с небольшими авторскими модификациями. Для каждого растения анализировали не менее 7 случайно отобранных семян из разных макростробил. Особенности репро-

дуктивного цикла у хвойных [11] позволяют с помощью аналитических методов вычленить материнский и отцовский вклад в генотип потомка. Путем “вычитания” гаплотипа эндосперма из генотипа зародыша семени [2], получали генотип пыльцевого зерна. Аллелям, которые были идентифицированы, присваивали порядковые номера 1, 2 и т.д.

Для оценки генетической изменчивости деревьев и зародышей их семян использовали типичные для популяционной генетики методы [1, 3]. Для сравнительного анализа материнских деревьев и зародышей их семян использовали F-статистики Райта [21] и G-статистики Нея [14]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ GenAlEx V6 [15], BIOSYS-1 [16]. Алельную и генотипическую гетерогенность выборок материнских растений, зародышей семян и пула пыльцы оценивали, используя стандартный χ^2 -тест [6].

Как у материнских растений, так и в их семенном потомстве был обнаружен 41 аллель, 32 аллеля присутствовало в пуле пыльцы (табл. 1). У материнских растений по изученным локусам обнаружено 46 генотипов, у семенного потомства – 58 (табл. 2). Среднее число аллелей (A) и генотипов (P_g) на локус для обеих выборок приведено в таблице 3.

Большее число генотипов в выборке зародышей может объясняться более высокой репрезентативностью выборки и не прошедшим еще до конца элиминирующим отбором. Выборке зародышей характерен достоверно меньший уровень гетерозиготности относительно материнских деревьев. Среднее значение индекса фиксации Райта (F) для выборки материнских растений -0,064, для зародышей 0,188. По совокупности локусов у материнских деревьев наблюдается небольшой избыток ($H_o - H_e = 1,5\%$), а в выборке зародышей 3,2 % дефицит гетерозигот соответственно (см. табл. 3). Это явление распространено у видов семейства Pinaceae Lindl.: на ранних онтогенетических стадиях растений, как правило, наблюдают недостаток гетерозиготных и эксцесс гомозиготных генотипов в результате инбридинга [7, 8, 9, 10]. Избыток гомозигот впоследствии элиминируется до небольшого эксцесса гетерозигот в генеративной части популяции, однако в некоторых популяциях существенный дефицит гетерозигот наблюдают также и у растений репродуктивного возраста [5,11]. В нашем исследовании значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга у материнских растений наблюдаются только по одному локусу, а у зародышей – по восьми. При этом во всех случаях они связаны с нехваткой гетерозигот (табл. 4).

Генетическая дифференциация по частотам аллелей между материнскими растениями и их семенным потомством минимальна: $F_{ST}/G_{ST} = 0,002$ и $0,001$ соответственно. Гетерогенность при сравнении зародышей и материнских растений по аллельному представительству не выявлена, по генотипическому – обнаружена для локусов *Dia-2* на 95% уровне значимости (*), *Mdh-3* на 99% уровне значимости (**). При сравнении частот аллелей выборки материнских растений и пула пыльцы гетерогенность значима в локусах *Got-1***, *Dia-4**, *Mdh-3***, *Mdh-4**, *Lap-1**. Так как генотипы пыльцы оценивались не непосредственно, а исходя из генотипов эндосперма и зародыша семени, то меньшее количество аллелей пула пыльцы может быть связано с ассортативностью скрещивания, дифференциальной жизнеспособностью пыльцы или яйцеклеток разных генотипов, либо дифференциальной смертностью зародышей разных генотипов. Все эти факторы завышают оценку инбредности потомства относительно материнских растений, имитируя последствия близкородственного скрещивания при возможном отсутствии такового.

Таблица 1. Частоты аллелей у материнских деревьев, зародышей их семян и пула пыльцы плюсовых деревьев архивно-клоновой плантации в степной зоне Украины

Локус	Аллель	Частоты аллелей			Локус	Аллель	Частоты аллелей		
		материнские деревья	зародыши семян	пул пыльцы			материнские деревья	зародыши семян	пул пыльцы
<i>Got-1</i>	1	0,059	0,028	0,005		1	0,721	0,702	0,612
	2	0,941	0,972	0,995		2	0,250	0,291	0,388
<i>Got-2</i>	1	0,368	0,378	0,408	<i>Mdh-3</i>	9	0,029	0,007	0,000
	2	0,618	0,619	0,592		1	0,088	0,069	0,073
	9	0,015	0,002	0,000		2	0,882	0,927	0,927
<i>Got-3</i>	1	0,250	0,268	0,274	<i>Mdh-4</i>	3	0,029	0,005	0,000
	2	0,706	0,690	0,685		1	0,206	0,163	0,142
	4	0,044	0,041	0,041		2	0,794	0,837	0,858
<i>Gdh</i>	1	0,397	0,374	0,361	<i>Adh-1</i>	1	0,074	0,050	0,037
	2	0,603	0,626	0,639		2	0,926	0,950	0,963
<i>Dia-1</i>	1	0,544	0,546	0,546	<i>Adh-2</i>	1	0,926	0,911	0,927
	2	0,441	0,447	0,454		2	0,074	0,089	0,073
	7	0,015	0,007	0,000		1	0,015	0,002	0,000
<i>Dia-2</i>	1	0,059	0,034	0,032	<i>Lap-1</i>	2	0,971	0,993	1,000
	2	0,926	0,963	0,968		3	0,015	0,005	0,000
	3	0,015	0,002	0,000		2	0,971	0,975	0,968
<i>Dia-4</i>	1	0,868	0,920	0,950	<i>Lap-2</i>	3	0,029	0,025	0,032
	2	0,132	0,080	0,050		2	0,882	0,913	0,890
<i>Mdh-2</i>	1	0,059	0,037	0,023	<i>Acp</i>	3	0,103	0,085	0,110
	2	0,926	0,959	0,977		5	0,015	0,002	0,000
	9	0,015	0,005	0,000		всего аллелей	41	41	32

Таблица 2. Частоты генотипов материнских деревьев и зародышей их семян в архивно-клоновой плантации плюсовых деревьев сосны обыкновенной в степной зоне Украины

Локус	Генотип	Частоты генотипов		Локус	Генотип	Частоты генотипов		Локус	Генотип	Частоты генотипов	
		материнские деревья	зародыши семян			материнские деревья	зародыши семян			материнские деревья	зародыши семян
<i>Got-1</i>	12	0,118	0,055	<i>Dia-2</i>	12	0,118	0,032	<i>Fdh</i>	11	0,000	0,032
	22	0,882	0,945		22	0,853	0,945		12	0,412	0,261
<i>Got-2</i>	11	0,147	0,179	<i>Dia-2</i>	23	0,029	0,005	<i>Adh-1</i>	22	0,588	0,706
	12	0,441	0,399		11	0,824	0,881		11	0,000	0,018
	22	0,382	0,417		12	0,088	0,078		12	0,147	0,064
	29	0,029	0,005		22	0,088	0,041		22	0,853	0,917
<i>Got-3</i>	11	0,088	0,124	<i>Mdh-2</i>	11	0,000	0,005	<i>Adh-1</i>	11	0,853	0,876
	12	0,324	0,275		12	0,118	0,060		12	0,147	0,069
	14	0,000	0,014		19	0,000	0,005		22	0,000	0,055
	22	0,500	0,541		22	0,853	0,927		12	0,029	0,005
	24	0,088	0,023		29	0,029	0,005		22	0,941	0,986
	44	0,000	0,023		11	0,441	0,550		23	0,029	0,009
<i>Gdh</i>	11	0,088	0,142	<i>Mdh-3</i>	12	0,500	0,294	<i>Lap-1</i>	22	0,941	0,950
	12	0,618	0,463		19	0,059	0,009		23	0,059	0,050
	22	0,294	0,394		22	0,000	0,142		22	0,765	0,853
	11	0,235	0,309		29	0,000	0,005		23	0,206	0,115
<i>Dia-1</i>	12	0,588	0,461	<i>Mdh-4</i>	11	0,000	0,005	<i>Asp</i>	25	0,029	0,005
	17	0,029	0,014		12	0,176	0,128		33	0,000	0,028
	22	0,147	0,217		22	0,765	0,858		всего генотипов		46
11	0,000	0,018	23	0,059	0,009						

Таблица 3. Значения основных показателей генетического полиморфизма материнских деревьев и их зародышей в архивно-клоновой плантации плюсовых деревьев сосны обыкновенной в степной зоне Украины (по 20 локусам)

Выборки	Доля полиморфных локусов * (P _{0,99})	Среднее число на локус		Средняя гетерозиготность	
		генотипы (P _g)	аллели (A)	ожидаемая (H _E)	наблюдаемая (H _O)
Материнские деревья	0,800	2,500	2,250	0,205 ± 0,014	0,215 ± 0,014
Зародыши семян	0,750	3,100	2,250	0,178 ± 0,005	0,146 ± 0,005
Средневзвешенная для выборок	0,750	3,019	1,880	0,181 ± 0,005	0,155 ± 0,005

* P_{0,99} - Локус считается полиморфным при частоте альтернативных аллелей ≥ 1 %

Таблица 4. Индекс фиксации Райта и значимость отклонений от равновесия Харди-Вайнберга у плюсовых деревьев и их семенного потомства из архивно-клоновой плантации *P. sylvestris* в степной зоне Украины

Локус	Материнские растения		Зародыши семян	
	индекс фиксации Райта (F)	значимость	индекс фиксации Райта (F)	значимость
<i>Got-1</i>	-0,063	0,133(1) n.s.	-0,028	0,175(1) n.s.
<i>Got-2</i>	0,026	0,660(3) n.s.	0,147	5,461(3) n.s.
<i>Got-3</i>	0,058	1,628(3) n.s.	0,306	78,179(3) ***
<i>Gdh</i>	-0,290	2,859(1) n.s.	0,010	0,024(1) n.s.
<i>Dia-1</i>	-0,213	2,478(3) n.s.	0,054	3,203(3) n.s.
<i>Dia-2</i>	-0,066	0,214(3) n.s.	0,482	58,212(3) ***
<i>Dia-4</i>	0,616	12,894(1) ***	0,472	48,545(1) ***
<i>Mdh-2</i>	-0,066	0,214(3) n.s.	0,134	14,212(3) **
<i>Mdh-3</i>	-0,339	5,112(3) n.s.	0,273	17,056(3) ***
<i>Mdh-4</i>	-0,106	0,604(3) n.s.	-0,007	0,156(3) n.s.
<i>Fdh</i>	-0,259	2,285(1) n.s.	0,041	0,367(1) n.s.
<i>Adh-1</i>	-0,079	0,214(1) n.s.	0,330	23,714(1) ***
<i>Adh-2</i>	-0,079	0,214(1) n.s.	0,578	72,730(1) ***
<i>Lap-1</i>	-0,023	0,031(3) n.s.	-0,005	0,010(3) n.s.
<i>Lap-2</i>	-0,030	0,031(1) n.s.	-0,026	0,146(1) n.s.
<i>Asp</i>	-0,117	0,604(3) n.s.	0,252	14,979(3) **
Среднее	-0,064	-	0,188	-

Примечания: В скобках приведено число степеней свободы; отличия достоверны при * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, n.s. - отличия недостоверны.

Аллельная структура плюсовых растений полностью воспроизводится в их потомстве, о чем свидетельствует равенство показателей A, а генотипическая структура семенного потомства отклоняется от структуры материнского насаждения из-за эксцесса гомозиготных генотипов у зародышей, что является нормальным для естественных популяций. Для лесосеменной плантации, однако, повышенная гомозиготность потомства является негативным фактором, так как неблагоприятно влияет на семенную продуктивность материнских растений и качество семян.

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 232 с.
2. Алтухов Ю.П., Крутовский К.В., Гафаров Н.И., и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). Сообщение 1. Системы полиморфизма и механизмы их генного контроля // Генетика. – 1986. – 22, № 8. – С. 2135 – 2151.
3. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. – 197 с.
4. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель: Б.и., 1989. – 162 с.
5. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
6. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. – 271 с.
7. 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.: КВІЦ, 2004. – С.234–238.
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. Пірко 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.
10. 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.
11. Раутиан А.С. О природе генотипа и наследственности // Журн. общ. биологии. – 1993. – 54, № 2. – С. 131–148.
12. Шигапов З.Х. Анализ индивидуальной частоты самоопыления клонов сосны обыкновенной на лесосеменных плантациях // Лесоведение. – 1997. – № 5. – С. 86–90
13. Davis B.J. Disk electrophoresis. II. Methods and applications to human serum proteins. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. – 121. – P. 67 – 65.
14. Nei M. Molecular population genetics and evolution. – New York: Amer. Elsev. Publ. Comp., Inc., 1975. – 278 p.
15. Peakall, R., and P. E. Smouse. 2005. GenAEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. Available via <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx>.
16. 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.
17. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. – 1969. – 9. – P. 395 – 420.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Получено 4.08.2006

УДК 575.1:582.475.4:634.0.2.232

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЕВЬЕВ И ИХ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

А.Е. Демкович

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Методом электрофореза в полиакриламидном геле оценена степень воспроизводства генетического материала плюсовых деревьев сосны обыкновенной в их потомстве. Изоферментными маркерами служат аллозимы (GOT, DIA, ADH, GDH, FDH, ACP, LAP, MDH, SOD). Обнаружены отклонения в расщеплении генотипов потомства в сторону инбридинга по локусам Got-3, Dia-2, Dia-4, Adh-1, Adh-2, Mdh-2, Mdh-3, Acp. Аллельное разнообразие материнских деревьев воспроизводится полностью.

UDC 575.1:582.475.4:634.0.2.232

GENETIC VARIATION OF SCOTCH PINE PLUS-TRESS AND THEIR SEED EMBRYOS

A.E. Demkovich

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

The maintenance of genetic material of scotch pine plus-trees in their seed embryos was determined by electrophoresis method in polyacrylamide gel. Allozymes served as isozymous markers (GOT, DIA, ADH, GDH, FDH, ACP, LAP, MDH, SOD). Deviation to inbreeding in embryo genotype segregation was revealed on Got-3, Dia-2, Dia-4, Adh-1, Adh-2, Mdh-2, Mdh-3, Acp loci. Allele diversity of maternal trees being maintained completely.