

Е.А. Мудрик

МУЛЬТИЛОКУСНАЯ СТРУКТУРА ОТЦОВСКИХ ГАМЕТ У ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН *PINUS PALLASIANA* D.DON ИЗ ПОПУЛЯЦИИ ГОРНОГО КРЫМА

зародыши семян, пул пыльцы, мультилокусные гаплотипы, отцовские гаметы, сосна крымская

Распространение генотипов внутри и между популяциями большинства видов растений во многом определяется движением пыльцы – главного вектора обмена мужскими гаметами между растительными организмами. Ограничение разлета пыльцы в популяции влияет на ее генетическую структуру, которая может воспроизводиться и поддерживаться в поколениях в исходном для генеративных особей объеме, а также приобретать новые генотипы или деградировать [11, 12], тем самым характеризуя поток генов как “консервативную”, так и “креативную” движущую силу эволюции [15]. В непрерывных популяциях хвойных большой радиус разлета пыльцы обеспечивает возможность свободного перекрестного опыления растений в континууме, однако в горных популяциях изменения экологических условий, связанные с высотным градиентом, могут вызывать асинхронность “цветения” растений разных высотных поясов, ограничивая поток генов между ними [5, 6, 8, 9]. Изоляция, вызванная ограничением движения пыльцы, приводит к определенной структурированности пыльцевого пула за счет растений – локальных доноров мужских гамет [11].

В популяции сосны крымской (*Pinus pallasiana* D.Don) в Горном Крыму, приуроченной к южному горному макросклону, ранее была изучена генетическая структура и установлены генотипы взрослых растений [2, 3] и их семенного потомства [1, 4], тогда как о генетических характеристиках пула пыльцы как у сосны крымской, так и у других видов хвойных сведений крайне мало или они вовсе отсутствуют.

Целью данной работы явилась оценка мультилокусной структуры отцовских гамет у зародышей семян *Pinus pallasiana* из разных высотных поясов популяции Горного Крыма и в общем пуле пыльцы.

В исследовании были использованы семена 92 деревьев *P. pallasiana*, собранные из четырех разновысотных поясов континуальной популяции на южном горном макросклоне в Крыму. Наличие в семенах хвойных гаплоидного эндосперма, гаплотип которого соответствует гаплотипу материнской яйцеклетки, позволяет различать материнские и отцовские аллели в генотипах диплоидных зародышей. Для установления гаплотипов отцовских гамет проводили параллельный электрофорез эндоспермов материнских растений и зародышей семян, после чего отцовские аллели определяли путем “вычитания” из генотипа зародыша материнских аллелей. Для каждого растения анализировали по 8 семян, следовательно общая выборка зародышей, а соответственно и мужских гамет составила 736 образцов: 144 для выборки из мыса Мартыян (ММ, 150 м над у.м.), 232, 160 и 200 гаплотипов соответственно в выборках возле поселка Никита – НИК-400, НИК-600, НИК-900 (400, 600 и 900 м над у.м.). Мультилокусную структуру отцовских гаплотипов устанавливали на основе анализа 3 полиморфных локусов 2 ферментных систем – глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К. Ф. 3. 4. 11. 1., локусы Got-2 и Got-3) и глутаматдегидрогеназы (GDH, К. Ф. 1. 4. 1. 2., локус Gdh). Электрофорез изоферментов проводили в полиакриламидном геле в триглицидиновой буферной системе согласно общепринятым методикам [10]. Обозначение аллелей и локусов осуществляли по номенклатуре С. Пракаша [14]. Межвыборочную гетерогенность частот гаплотипов оценивали с помощью стандартного критерия χ^2 .

Таблица 1. Частоты аллелей в пуле пыльцы *Pinus pallasiana* D. Don. из разных высотных поясов популяции Горного Крыма

Локус	Аллель	Высотные пояса				Во всей популяции
		ММ	НИК-400	НИК-600	НИК-900	
Got-2 (A)	1.00 (A ₂)	0,486	0,625	0,694	0,585	0,602
	1.12 (A ₁)	0,514	0,375	0,306	0,415	0,398
Got-3 (B)	1.00 (B ₂)	0,993	0,957	0,938	0,905	0,946
	1.50 (B ₁)	0,007	0,043	0,062	0,095	0,054
Gdh (C)	0.90 (C ₃)	0	0,026	0,006	0,010	0,012
	1.00 (C ₂)	0,986	0,953	0,925	0,965	0,957
	1.12 (C ₁)	0,014	0,021	0,069	0,025	0,031

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: ММ – мыс Мартыян, НИК-400 – Никита, 400 м над у.м., НИК-600 – Никита, 600 м над у.м., НИК-900 – Никита, 900 м над у.м.

В пуле пыльцы *P. pallasiana* по трем исследуемым локусам обнаружено 7 аллелей, частота которых для разновысотных выборок и всей популяции представлены в таблице 1. Частота преобладающих аллелей (с индексом 1.00) по всем локусам в популяционной выборке составила $\geq 0,602$. Сочетание аллелей трех локусов предполагает существование 12 возможных их комбинаций в мужских гаметах, однако реально в процессе оплодотворения приняли участие 9 из них, и ни одна из разновысотных выборок *P. pallasiana* не имела всех выявленных гаплотипов, имеющих в популяции в целом (табл. 2). Наименьшим качественным представителем отцовских гаплотипов (5 комбинаций) характеризовалась выборка ММ. Этот факт может объясняться тем, что выборка растений из мыса Мартыян находится в некоторой пространственной изоляции от выборок НИК-400, НИК-600, НИК-900 и представлена 18 деревьями *P. pallasiana*, которые произрастают разреженно и в сочетании с другими породами растений. Напротив, в популяции сосны ежовой (*Pinus echinata* Mill.) отмечена отрицательная корреляция между плотностью древостоя и количеством уникальных мужских гаплотипов, что объясняется авторами результатом затруднения движения пыльцы из-за близко произрастающих деревьев [11].

Частоты отцовских гаплотипов зародышей семян *P. pallasiana* из выборки ММ достоверно гетерогенны с таковыми из вышерасположенных поясов (табл. 3), причем, как видно из таблицы 1, гетерогенность обусловлена аллелями первого локуса Got-2 (A). Частоты гаплотипов A₁B₂C₂ и A₂B₂C₂ выборки ММ отличаются от соответствующих частот в выборках НИК-400, НИК-600 и НИК-900 и максимально приближены к значениям частот аллелей A₁ и A₂ в пыльцевом пуле ММ (см. табл. 1, 2). Среднепоясные выборки НИК-400 и НИК-600 и выборка зародышей семян *P. pallasiana* из верхнего пояса популяции (НИК-900) характеризуются большим разнообразием отцовских гаплотипов по трем локусам в сравнении с выборкой ММ (см. табл. 2). При анализе гетерогенности многолокусных гаплотипов нами была обнаружена достоверная генетическая неоднородность отцовских гамет между среднепоясными выборками НИК-400 и НИК-600, а также между выборками НИК-600 и НИК-900 (см. табл. 3). Эти отличия в пыльцевом пуле, видимо, являются следствием разнокачественности отцовских гаплотипов сравниваемых выборок, а также отличий в количестве вариантов отцовских гамет по изучаемым локусам и соответственно в их частотах (см. табл. 2). Вся изучаемая популяция *P. pallasiana* достоверно гетерогенна по частотам отцовских мультилокусных гаплотипов (см. табл. 3).

Таблица 2. Возможные отцовские гаплотипы, ожидаемые и наблюдаемые их частоты в выборках зародышей семян материнских растений *Pinus pallasiana* D.Don. из разных высотных поясов популяции Горного Крыма

Гаплотип	Высотные пояса												Во всей популяции	
	ММ			НИК-400			НИК-600			НИК-900				
	кол-во	частота		кол-во	частота		кол-во	частота		кол-во	частота			
		f_E	f_O		f_E	f_O		f_E	f_O		f_E	f_O	f_E	f_O
A ₁ B ₂ C ₂	74	0,503	0,514	85	0,342	0,366	48	0,266	0,300	75	0,363	0,375	0,360	0,389
A ₂ B ₂ C ₂	67	0,476	0,465	126	0,570	0,543	91	0,602	0,569	98	0,511	0,490	0,545	0,464
A ₂ B ₁ C ₂	1	0,003	0,007	7	0,026	0,030	5	0,040	0,031	12	0,054	0,060	0,031	0,044
A ₂ B ₂ C ₁	1	0,007	0,007	5	0,013	0,022	8	0,045	0,050	4	0,013	0,020	0,018	0,033
A ₁ B ₁ C ₂	0	0,004	0	3	0,016	0,013	4	0,017	0,025	8	0,038	0,040	0,020	0,031
A ₁ B ₂ C ₁	1	0,007	0,007	0	0,008	0	2	0,020	0,013	1	0,010	0,005	0,012	0,009
A ₁ B ₂ C ₃	0	0	0	1	0,009	0,004	1	0,002	0,006	1	0,004	0,005	0,005	0,005
A ₁ B ₁ C ₁	0	0	0	0	0	0	1	0,001	0,006	0	0,001	0	0,001	0,006
A ₂ B ₂ C ₃	0	0	0	5	0,016	0,022	0	0,004	0	1	0,005	0,005	0,007	0,019
A ₂ B ₁ C ₁	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0	0	0,001	0	0,001	0
A ₂ B ₁ C ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A ₁ B ₁ C ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Всего	144	1,000	1,000	232	1,000	1,000	160	1,000	1,000	200	1,000	1,000	1,000	1,000

Примечание. f_E - ожидаемая частота, f_O - наблюдаемая частота гаплотипа, кол-во - количество.

Таблица 3. Гетерогенность отцовских гаплотипов выборок зародышей семян материнских растений *Pinus pallasiana* D.Don. из выборок разных высотных поясов популяции Горного Крыма

Выборка	Высотные пояса				Во всей популяции
	ММ	НИК-400	НИК-600	НИК-900	
ММ	-	16,35* (7)	18,43* (7)	18,29* (7)	47,92** (24)
НИК-400		-	32,29*** (8)	n.s.	
НИК-600			-	22,43** (8)	
НИК-900				-	

Примечание. В скобках указаны числа степеней свободы. Различия достоверны при * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, n.s. – различия несутественны.

Следует отметить, что среди установленных нами гаплотипов пыльцы наиболее распространены два варианта – $A_2 B_2 C_2$ и $A_1 B_2 C_2$, причем гаплотип с наибольшей частотой $A_2 B_2 C_2$ является комбинацией основных (предоминантных) аллелей (см. табл. 1), которые по всем трем локусам преобладают и у материнских растений, и у зародышей семян [4]. Оказалось, что у материнских растений, гомозиготных по этим двум комбинациям аллелей ($A_2 B_2 C_2$ и $A_1 B_2 C_2$), при формировании семенного потомства преимущество имеют гаплотипы пыльцы с идентичными аллелями (табл. 4). Кроме того, гомозиготные по предоминантным аллелям материнские растения $A_2 B_2 C_2$ оплодотворяются меньшим количеством вариантов отцовских гамет, по сравнению с материнскими растениями $A_1 B_2 C_2$. Частоты отцовских гаплотипов в выборках зародышей семян гомозиготных растений с соответствующими аллелями велики и отличаются между собой и по сравнению с общепопуляционной выборкой (см. табл. 4).

Таблица 4. Частоты отцовских гаплотипов в выборках зародышей семян гомозиготных материнских растений из популяции *Pinus pallasiana* D.Don. в Горном Крыму и в общей выборке растений этой популяции

Гаплотип	Гомозиготные материнские растения по аллелям				Общая выборка растений из популяции	
	$A_1 B_2 C_2$ (21)		$A_2 B_2 C_2$ (13)			
	кол-во	частота	кол-во	частота	кол-во	частота
$A_1 B_2 C_2$	101	0,601	20	0,192	282	0,389
$A_2 B_2 C_2$	56	0,333	75	0,721	382	0,464
$A_2 B_1 C_2$	3	0,017	2	0,019	25	0,044
$A_2 B_2 C_1$	0	0	6	0,058	18	0,033
$A_1 B_1 C_2$	3	0,017	0	0	15	0,031
$A_1 B_2 C_1$	2	0,012	0	0	4	0,009
$A_1 B_2 C_3$	1	0,006	0	0	3	0,005
$A_1 B_1 C_1$	1	0,006	0	0	1	0,006
$A_2 B_2 C_3$	1	0,006	1	0,010	6	0,019
Всего	168	1,000	104	1,000	736	1,000

Примечание. В скобках указано количество изученных деревьев; кол-во – количество.

Видимо, преимущество таких гамет в пуле пыльцы приводит к повышенной гомозиготации потомства, которая отмечается на стадии зародыша у большинства видов хвойных [7], а также была ранее установлена нами для *P. pallasiana* [1, 4]. Наличие редких гаплотипов пыльцы вносит определенную гетерогенность в пыльцевой пул разновысотных выборок и всей изучаемой популяции *P. pallasiana*, однако существенно не изменяет его состав. Расчеты значений ожидаемых частот гаплотипов во всех выборках и популяции в целом не выявили резких противоречий по сравнению с наблюдаемыми, а показатели приспособленности основных гаплотипов, оцениваемые как отношение фактических частот к ожидаемым, практически одинаковы в разновысотных выборках и всей популяции *P. pallasiana*: для гаплотипов $A_1 B_2 C_2$ и $A_2 B_2 C_2$ значения относительной приспособленности равны 1,02 и 0,97, 1,07 и 0,95, 1,13 и 0,94, 1,03 и 0,96, а также 1,08 и 0,85 соответственно в выборках ММ, НИК-400, НИК-600, НИК-900 и всей популяции.

Как видно из вышесказанного, пыльцевой пул изучаемой популяции *P. pallasiana* однороден, а успех оплодотворения растений в разновысотных выборках зависит, по-видимому, от генетических особенностей самих опыляемых материнских деревьев. Наше заключение согласуется с данными, полученными при анализе материнских растений, зародышей семян и пула пыльцы прибрежной и удаленной от моря популяций ели сизой (*Picea glauca* (Moench) Voss). Авторы отметили, что большинство растений обеих популяций опыляются пыльцой одного и того же пула [13]. Максимальной приспособленностью в пуле пыльцы изучаемой нами популяции *Pinus pallasiana* характеризуются два отцовских гаплотипа ($Got-2^{1.00} Got-3^{1.00} Gdh^{1.00}$ и $Got-2^{1.12} Got-3^{1.00} Gdh^{1.00}$), по-видимому, обладающие наиболее адаптированными сочетаниями генов.

1. Коршиков И.И., Мудрик Е.А. Генетическая гетерогенность урожая семян разных лет в природной популяции сосны крымской // Факторы экспериментальной эволюции: Сб. науч. пр./ За ред. М.В. Роика. - К.: КВЦ. - 2004. - С. 234-238.
2. Коршиков И.И., Терлыга Н.С. Генетическая изменчивость сосны крымской в природных популяциях Крыма и искусственных насаждениях Кривбасса // Цитология и генетика. - 2000. - 34, №6. - С. 21-29.
3. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской). - Донецк: ООО "Лебедь". - 2002. - 328 с.
4. Мудрик Е.А., Горлова Е.М. Генетическая гетерогенность семенного потомства природной популяции сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) // Промышленная ботаника. - 2003. - Вып. 3. - 91-94.
5. Петрова И.В., Санников С.Н., Филиппова Т.В. Градиентный анализ хорогенетической структуры равнинных и горных популяций сосны обыкновенной // Экология. - 2000. - №4. - С.281-286.
6. Подгорный Ю.К. Закономерности формирования популяционной структуры горных растений и пути их использования в интродукции, селекции, охране генофондов (на примере сосны крымской). Автореф. дис. ...-ра биол. наук: 03.00.05. - М., 1995. - 52 с.
7. 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.
8. Шурхал А.В., Подогас А.В., Животовский Л.А., Подгорный Ю.К. Изучение генетической изменчивости крымской сосны // Генетика. - 1988. - 24, № 2. - С. 311-315.
9. Changtragoon S., Finkeldey R. Patterns of genetic variation and characterization of the mating system of *Pinus merkusii* in Thailand // Forest Genet. - 1995. - 2. - P. 87-97.
10. Davis B.J. Disk electroforesis. II. Methods and applications to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1964. - 121. - P. 67-65.
11. Dyer R.J., Sork V.L. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. // Molecular Ecology. - 2001. - 10. - P. 859-866.
12. Ennos R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations // Heredity. - 1994. - 72. - P. 250-259.

13. Innes, D.J, Ringius, G.G. Mating system and genetic structure of two populations of white spruce (*Picea glauca*) in eastern Newfoundland // Can. J. Bot. – 1990.– 68. – P. 1661-1666.
14. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. – 1969. – 61. – P. 841-858.
15. Slatkin M. Gene flow in natural populations // Annual Review of Ecology and Systematics. – 1985. – 16. – P. 393-430.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Получено 31.03.2005

УДК 581.15: 581.35: 582.475.4 (477.75)

МУЛЬТИЛОКУСНАЯ СТРУКТУРА ОТЦОВСКИХ ГАМЕТ У ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН *PINUS PALLASIANA* D. DON ИЗ ПОПУЛЯЦИИ ГОРНОГО КРЫМА

Е. А. Мудрик

Донецкий ботанический сад НАН Украины

На основе анализа 3 полиморфных локусов 2 ферментных систем установлены многолокусные отцовские гаплотипы зародышей семян в популяции *P. pallasiana* в Горном Крыму. Отмечена однородность пула пыльцы, принявшей участие в формировании семенного потомства *P. pallasiana*, свидетельствующая об отсутствии жестких изоляционных барьеров между разновысотными поясами популяции. Максимальной приспособленностью характеризуются два отцовских гаплотипа (Got-2^{1.00} Got-3^{1.00} Gdh^{1.00} и Got-2^{1.12} Got-3^{1.00} Gdh^{1.00}), по-видимому, обладающие наиболее адаптированными сочетаниями генов.

UDC 581.15: 581.35: 582.475.4 (477.75)

MULTILOCUS STRUCTURE OF MALE GAMETES IN SEED EMBRYOS OF *PINUS PALLASIANA* D. DON FROM A POPULATION IN THE MOUNTAINOUS CRIMEA

E. A. Mudrik

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

On the basis of analysis of 3 polymorphic loci of 2 enzyme systems, multilocus male haplotypes of the seed embryos from *Pinus pallasiana* population in Mountainous Crimea have been found. Homogeneity of pollen pool participating in the forming of seed progenies was observed. This homogeneity is indicative of the absence of strong isolation barriers between different altitudinal belts of the population. Two male haplotypes (Got-2^{1.00} Got-3^{1.00} Gdh^{1.00} и Got-2^{1.12} Got-3^{1.00} Gdh^{1.00}) are characterized by maximum adaptational properties and probably have the most adapted gene combinations.