

И.И. КОРШИКОВ, А.Е. ДЕМКОВИЧ

Донецкий ботанический сад НАН Украины

E-mail: donetsk-sad@mail.ru

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ КЛОНОВ И ИХ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА В АРХИВНО- КЛОНОВОЙ ПЛАНТАЦИИ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ



*Изучена генетическая изменчивость по 12 аллозимным локусам (10 полиморфных) архивно-клоновой плантации 23 плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. и их семенного потомства на юго-востоке Украины. Более половины клонов имели 4–8 гетерозиготных локусов, а их семенное потомство отличалось меньшим уровнем изменчивости, чем материнские растения. Семенное потомство получено от высокой доли ауткроссинга ($t_m = 95\%$). Для потомства клонов характерна повышенная доля нарушений сегрегации аллелей в мегагаметофитах и высокая встречаемость существенных отклонений в распределении генотипов зародышей семян от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга.*

© И.И. КОРШИКОВ, А.Е. ДЕМКОВИЧ, 2010

Введение. Решение важнейшей задачи лесного хозяйства Украины – воспроизводство генофонда главных лесообразующих пород – осложняется двумя основными проблемами: трудностью сохранения при возрастающем спросе на древесину лучших природных популяций как источника ценного генофонда и недостаточностью разработки генетико-селекционных вопросов семеноводства. Для искусственного лесоразведения как наиболее быстрого способа лесовосстановления требуется массовое получение семян лесных пород с ценными наследственными свойствами. Во второй половине XX века эта проблема начинала активно решаться через создание лесосеменных плантаций, лучшими среди которых с позиций селекционно-семеноводческой базы считались клоновые плантации плюсовых деревьев. Именно создание новых лесов на такой селекционной основе должно было обеспечить их устойчивость и высокую продуктивность [1].

Проблема селекционного семеноводства главной лесообразующей породы Украины – сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), несмотря на то, что первая клоновая плантация была создана еще в 80-е годы XX века [1], остается актуальной как с практических, так и с научных позиций [2]. Одна из причин этого – недостаточная изученность вопросов наследования селективируемых признаков [3] и отсутствие при закладке плантаций предварительной генетической оценки плюсовых деревьев и их потомства [4, 5]. Жизнеспособность семенного потомства и развитие из него высокопродуктивных растений зависит от многих факторов, наиболее важные из которых – генетическая структура плантаций и система скрещивания растений, а точнее доля ауткроссинга [6].

Стратегическим направлением селекционного семеноводства считается популяционное – на базе лучших местных древостоев, характеризующихся высоким уровнем генетического разнообразия. Считается, что соблюдение популяционной основы необходимо и при формировании клоновых лесосеменных плантаций плюсовых деревьев. За счет этого можно достигнуть относительной стабильности и целостности популяционно-генетической структуры в семенном потомстве [7]. Однако при этом необходимо использовать большое количество растений, так как при малом их числе

возможна потеря редких аллелей, снижение уровня полиморфизма и устойчивости будущих насаждений [8]. Перед созданием лесосеменных плантаций важно определить гетерозиготность плюсовых деревьев, так как высокогетерозиготные растения могут нести рецессивные сублетальные аллели [6, 9]. При подборе таких растений генетическая структура плантации не способствует получению высококачественного урожая семян [10].

С генетико-селекционной точки зрения при формировании клоновой лесосеменной плантации необходим не только мониторинг генотипических особенностей плюсовых деревьев, но и их семенного потомства. Важно также выяснить вклад отдельных плюсовых деревьев в генный пул семян лесосеменной плантации [3] и определить систему скрещивания растений [6]. Анализ генетического полиморфизма

мегагаметофитов и зародышей семян с использованием изоферментов в качестве молекулярных маркеров позволяет выяснить у хвойных генетические особенности материнских деревьев, их семенного потомства (зародышей) и определить вклад отцовских гамет в его формирование [10].

Цель работы – выяснение индивидуальных генетических отличий клонов и их семенного потомства в архивно-клоновой плантации плюсовых деревьев сосны обыкновенной.

Материалы и методы. Семена были собраны с клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* архивно-клоновой плантации, заложенной в одном из лесхозов Харьковской области под руководством П.И. Молоткова [1]. Для определения генотипа материнского дерева в электрофоретическом анализе использовали 7–8 семян. Электрофорез ферментов, экстрагируемых из

Таблица 1

Сегрегация аллелей у гетерозиготных клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L.

№ клона	Локус									
	Got-1	Got-2	Got-3	Gdh	Dia-1	Mdh-2	Mdh-3	Fdh	Lap-2	Acp
1	m	43 : 48	49 : 42	52 : 39	m	m	m	m	m	m
2	m	25 : 21	m	m	m	14 : 32 **	21 : 25	8 : 38 ***	m	m
3	m	18 : 17	14 : 21	19 : 16	21 : 14	m	m	m	m	27 : 8 **
4	m	73 : 49 *	53 : 69	48 : 74 *	46 : 76 **	m	53 : 69	m	m	m
5	m	17 : 15	m	21 : 11	12 : 20	m	7 : 25 **	m	m	m
6	12 : 20	16 : 16	17 : 15	1 : 31 ***	20 : 12	3 : 29 ***	28 : 4 ***	m	28 : 4 ***	22 : 10 *
7	m	m	m	m	m	m	m	15 : 25	m	m
8	10 : 22 *	14 : 18	14 : 18	7 : 25 **	29 : 3 ***	m	17 : 15	m	m	m
9	10 : 99 ***	58 : 51	53 : 56	53 : 56	56 : 53	m	56 : 53	m	m	m
10	9 : 21 *	12 : 18	m	m	12 : 18	m	m	m	m	m
11	19 : 26	m	25 : 20	m	m	m	20 : 25	m	m	m
12	m	31 : 52 *	m	36 : 47	36 : 47	m	38 : 45	39 : 44	m	m
13	m	17 : 18	m	m	m	m	19 : 16	m	m	m
14	m	m	m	m	45 : 39	m	m	m	m	46 : 38
16	m	m	m	23 : 23	30 : 16 *	m	27 : 19	17 : 29	m	39 : 7 ***
17	m	m	13 : 21	19 : 15	11 : 23 *	m	18 : 16	14 : 20	m	m
18	m	m	m	27 : 25	24 : 28	m	24 : 28	m	m	36 : 16 **
22	m	16 : 35 **	m	26 : 25	m	m	m	21 : 30	m	m
23	27 : 34	m	m	35 : 26	38 : 23	m	24 : 37	25 : 36	m	m
24	m	41 : 63 *	m	m	70 : 34	m	m	60 : 44	m	m
26	m	m	27 : 31	m	***	m	38 : 20 *	m	1 : 57 ***	57 : 1 ***
28	m	42 : 7 ***	33 : 16 *	22 : 27	33 : 25	m	25 : 24	m	m	m
32	m	m	12 : 23	21 : 14	m	1 : 34 ***	22 : 13	18 : 17	m	m

Примечание. Нарушения сегрегации достоверны (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ соответственно), m – растение гомозиготно.

Значения коэффициента инбридинга особи относительно выборки (F_{IS}) и отличия и семенного потомства каждого из клонов

№ клона	Локус				
	Got-1	Got-2	Got-3	Gdh	Dia-1
1	-0,011 ***	0,119 ***	-0,053 ***	-0,279 n.s.	-0,329 *
2	m ***	-0,436 *	-0,113 ***	-0,165 ***	-0,034 ***
3	m **	-0,266 n.s.	0,076 n.s.	-0,346 n.s.	0,029 n.s.
4	-0,012 ***	-0,146 ***	-0,172 n.s.	-0,341 n.s.	-0,051 **
5	m **	-0,576 n.s.	-0,362 n.s.	-0,255 n.s.	-0,314 n.s.
6	0,167 n.s.	-0,016 n.s.	0,044 **	-0,202 n.s.	-0,063 n.s.
7	m ***	-0,333 n.s.	-0,445 **	-0,194 **	-0,231 *
8	-0,026 n.s.	-0,004 *	-0,347 n.s.	-0,205 n.s.	-0,097 n.s.
9	0,069 n.s.	-0,131 ***	-0,015 ***	-0,457 n.s.	-0,344 *
10	-0,231 n.s.	0,109 n.s.	-0,053 ***	-0,177 **	-0,303 n.s.
11	-0,388 **	-0,406 n.s.	-0,334 *	-0,525 n.s.	-0,406 n.s.
12	-0,018 ***	-0,441 **	-0,318 ***	-0,381 n.s.	-0,232 *
13	-0,029 *	-0,543 *	-0,045 ***	-0,207 **	-0,061 ***
14	-0,012 ***	-0,254 **	-0,436 ***	-0,344 *	-0,333 n.s.
16	-0,011 **	-0,196 *	-0,279 n.s.	-0,220 n.s.	-0,628 n.s.
17	-0,015 *	-0,283 n.s.	-0,335 n.s.	0,218 n.s.	-0,536 *
18	-0,010 **	-0,040 ***	-0,491 **	-0,424 n.s.	-0,541 n.s.
22	-0,030 *	-0,087 n.s.	-0,239 n.s.	-0,144 n.s.	-0,342 n.s.
23	-0,301 ***	-0,245 *	-0,326 **	-0,196 n.s.	-0,302 ***
24	-0,015 ***	-0,430 ***	-0,300 ***	-0,231 ***	0,192 *
26	-0,018 **	-0,027 ***	0,062 **	-0,318 ***	0,512 *
28	-0,021 **	0,034 ***	0,220 ***	0,315 n.s.	-0,343 n.s.
32	m **	-0,094 **	-0,268 n.s.	0,132 n.s.	-0,146 n.s.
Выборка клонов	-0,150	-0,199	0,098	-0,345	-0,413

Примечание. Различия достоверны при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s. различия недостоверны, m –

эндосперма каждого семени, проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля [11]. Условия экстракции, электрофоретического разделения и гистохимического окрашивания ферментов, идентификация аллелей и их номенклатура подробно описаны нами ранее [12]. В исследовании были задействованы восемь ферментных систем: глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, К.Ф. 2.6.1.1), диафороаза (DIA, К.Ф. 1.6.4.3), супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1), кислая фосфатаза (ACP, К.Ф. 3.1.3.2), лейцинаминопептидаза (LAP, К.Ф. 3.4.11.1) и малатдегидрогеназа (MDH, К.Ф. 1.1.1.37). Для определения внутрипопуляционной дифференциации применяли традиционные популяционно-генетические показатели [13, 14]. При статистической обра-

ботке электрофоретических данных использовали пакеты компьютерных программ и программы MLTR [14], BIOSYS-1 [15], GenAIEX 6 [16], GenRes 3.12 [17].

Результаты исследований и их обсуждение.

У группы клонов 23 плюсовых деревьев 10 аллозимных локусов из 12 используемых в анализе были полиморфны, а два – Sod-4 и Lap-1 – мономорфны. Клоны были гетерозиготны минимум по одному (№ 7), максимум по девяти (№ 6) локусам. Исследования сегрегации аллелей в мегагаметофитах показали, что только у 6 из 23 клонов не выявлено существенных отклонений (табл. 1). Нарушение сегрегации в одном локусе обнаружено у 9 клонов, в двух локусах – у 4 клонов, трех локусов – у 3 клонов и пяти локусов – у одного клона. Всего отмечена 31 гетерозигота с нарушением сегре-

в аллельной структуре объединенной выборки плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. (зародыши семян клонов плюсовых деревьев)

Локус					
Mdh-2	Mdh-3	Fdh	Lap-1	Lap-2	Asp
-0,255 *	-0,444 n.s.	-0,124 n.s.	-0,034 n.s.	-0,083 n.s.	-0,040 *
0,109 **	-0,150 ***	-0,260 n.s.	-0,022 n.s.	-0,011 n.s.	-0,022 *
-0,061 n.s.	-0,273 n.s.	-0,029 **	-0,029 n.s.	-0,045 n.s.	0,461 **
-0,047 n.s.	0,106 *	-0,109 n.s.	-0,008 n.s.	-0,021 n.s.	-0,084 n.s.
-0,208 n.s.	0,451 ***	-0,333 n.s.	-0,024 n.s.	-0,049 n.s.	-0,067 n.s.
-0,067 n.s.	0,264 **	-0,049 *	-0,024 n.s.	-0,164 n.s.	-0,123 *
-0,212 n.s.	-0,356 n.s.	-0,222 n.s.	-0,026 n.s.	-0,026 n.s.	-0,026 n.s.
-0,016 n.s.	0,067 n.s.	-0,049 *	-0,016 n.s.	-0,016 n.s.	-0,067 n.s.
-0,038 n.s.	-0,290 n.s.	-0,048 ***	-0,028 n.s.	-0,014 n.s.	-0,028 **
-0,071 n.s.	-0,132 **	-0,364 n.s.	-0,071 n.s.	-0,071 n.s.	-0,111 n.s.
-0,059 n.s.	-0,289 n.s.	-0,286 n.s.	-0,047 n.s.	-0,125 n.s.	-0,098 n.s.
-0,025 n.s.	-0,473 *	-0,166 **	-0,025 n.s.	-0,025 n.s.	-0,221 n.s.
-0,029 n.s.	-0,200 n.s.	-0,273 n.s.	-0,015 n.s.	-0,015 n.s.	-0,061 n.s.
-0,037 n.s.	-0,050 ***	-0,024 ***	-0,018 n.s.	-0,031 n.s.	-0,005 ***
-0,058 n.s.	-0,291 n.s.	-0,335 n.s.	-0,022 n.s.	-0,058 n.s.	0,015 n.s.
-0,063 n.s.	-0,181 n.s.	-0,383 *	-0,046 n.s.	-0,046 n.s.	-0,030 n.s.
-0,040 n.s.	-0,316 *	-0,040 **	-0,040 n.s.	-0,040 n.s.	-0,105 **
-0,063 n.s.	-0,214 *	-0,052 *	-0,030 n.s.	-0,010 n.s.	-0,030 *
-0,061 n.s.	0,023 n.s.	0,030 *	-0,043 n.s.	-0,034 n.s.	-0,043 n.s.
-0,025 n.s.	-0,276 n.s.	0,516 **	-0,020 n.s.	-0,020 n.s.	-0,030 **
-0,084 n.s.	0,086 *	-0,055 **	m n.s.	-0,038 n.s.	-0,036 *
m *	0,532 n.s.	m ***	m n.s.	m n.s.	-0,167 n.s.
-0,015 n.s.	-0,120 n.s.	0,191 n.s.	-0,015 n.s.	-0,029 n.s.	-0,045 n.s.
-0,070	-0,533	-0,243	m	-0,034	-0,127

выборка гомозиготна.

гации аллелей, что составило 31,6 % их общего числа. Касались эти нарушения всех 10 полиморфных локусов с разной долей встречаемости. Случаи нарушения сегрегации аллелей нередки в популяциях разных видов хвойных при определении генетического контроля изоферментов. Так, например, из 134 гетерозигот ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) у 29 обнаружено достоверное смещение в сегрегации от ожидаемого менделевского расщепления 1 : 1 [10], что составило 21,6 %. У сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) из природных популяций Горного Крыма выявлено 26,7 % гетерозигот со значимым нарушением сегрегации аллелей, а в искусственных насаждениях *P. pallasiana* вблизи крупных металлургических и горно-перерабатывающих комбинатов Криворожья доля гетерозигот с достовер-

но смещенным распределением аллелей составила 53,5 % [18]. У клонов *P. sylvestris* высокоизменчивые локусы – Got-2, Got-3, Gdh, Dia-1, Mdh-3, Fdh отличались меньшей долей существенных нарушений сегрегации аллелей, чем низкоизменчивые локусы – Got-1, Mdh-2, Lap-2 и Asp. Так, доля таких нарушений у первых была 22,2 %, а у вторых – 70,6 %. По локусам Got-1 и Gdh наблюдалось однотипное нарушение сегрегации – доминирование медленного по электрофоретической подвижности аллеля над быстрым, а в случае локуса Asp это происходило наоборот. В целом из этого анализа следует, что у отдельных клонов происходит неравный вклад аллелей материнских гамет по некоторым гетерозиготным локусам в формирование семенного потомства. Причины значимых отклонений в сегрега-

Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности у зародышей семян клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. архивно-клоновой плантации

№ клона	Наблюдаемая гетерозиготность H_O у клонов	Зародыши семян		
		Наблюдаемая гетерозиготность H_O	Ожидаемая гетерозиготность H_E	Коэффициент инбридинга F_{IS}
7	0,091	0,318 ± 0,019	0,247 ± 0,019	-0,274
13	0,182	0,230 ± 0,018	0,190 ± 0,018	-0,247
14	0,182	0,275 ± 0,012	0,223 ± 0,012	-0,230
В среднем	—	0,278 ± 0,010	0,222 ± 0,010	-0,245
1	0,273	0,342 ± 0,013	0,292 ± 0,013	-0,165
10	0,273	0,303 ± 0,023	0,262 ± 0,023	-0,141
11	0,273	0,440 ± 0,020	0,330 ± 0,020	-0,324
22	0,273	0,291 ± 0,017	0,251 ± 0,017	-0,145
24	0,273	0,281 ± 0,011	0,260 ± 0,011	-0,068
В среднем	—	0,324 ± 0,008	0,278 ± 0,008	-0,150
2	0,364	0,249 ± 0,016	0,213 ± 0,016	-0,159
5	0,364	0,355 ± 0,022	0,287 ± 0,022	-0,224
18	0,364	0,322 ± 0,016	0,256 ± 0,016	-0,324
28	0,364	0,200 ± 0,015	0,254 ± 0,017	0,147
В среднем	—	0,276 ± 0,009	0,250 ± 0,009	-0,135
3	0,455	0,283 ± 0,020	0,263 ± 0,020	-0,063
4	0,455	0,329 ± 0,011	0,286 ± 0,011	-0,111
12	0,455	0,392 ± 0,014	0,300 ± 0,014	-0,303
16	0,455	0,368 ± 0,019	0,295 ± 0,019	-0,261
17	0,455	0,404 ± 0,021	0,288 ± 0,021	-0,210
23	0,455	0,361 ± 0,016	0,308 ± 0,016	-0,161
26	0,455	0,194 ± 0,014	0,247 ± 0,015	0,088
В среднем	—	0,334 ± 0,006	0,286 ± 0,006	-0,148
8	0,545	0,276 ± 0,021	0,254 ± 0,021	-0,080
9	0,545	0,335 ± 0,011	0,278 ± 0,011	-0,204
32	0,545	0,249 ± 0,019	0,240 ± 0,019	-0,026
В среднем	—	0,307 ± 0,010	0,266 ± 0,010	-0,146
6	0,818	0,315 ± 0,023	0,308 ± 0,023	-0,009
В среднем по совокупности	—	0,313 ± 0,004	0,269 ± 0,004	-0,155
Материнские растения	—	0,387 ± 0,027	0,313 ± 0,027	-0,215

ции аллелей могут быть разными: мейотические нарушения, гаметический драйв, эмбриональный или гаметический отбор [10]. Как показано на примере сосны Банка (*Pinus banksiana* Lamb.), нарушение сегрегации аллелей у одних и тех же растений может варьировать в разные годы и зависит от расположения шишек в ярусе кроны деревьев [16]. В экстремальных условиях доля гетерозигот с нарушением сегрегации аллелей может возрастать [18].

Семенное потомство клонов плюсовых деревьев по аллельной структуре не отличается

от них самих, однако частоты аллелей в пуле зародышей семян отдельных клонов существенно смещены в сравнении с частотами аллелей в общей выборке клонов (табл. 2). Судя по большому числу отрицательных значений коэффициента инбридинга особи относительно выборки (F_{IS}), расхождение с генотипическим составом общей выборки клонов связано с избытком гетерозигот у зародышей отдельных клонов. Существенные отличия в генетической структуре семенного потомства клонов в сравнении со структурой их общей выборки

Таблица 4

Отклонения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга в выборках зародышевой семян клонов плюсовых деревьев *Pinus subvestris* L., χ^2 -тест

№ клона	Локус												
	Got-1	Got-2	Got-3	Gdh	Dia-1	Mdh-2	Mdh-3	Fdh	Lap-1	Lap-2	Asp		
1	n.s.	n.s.	n.s.	7,06 (1) ++	9,82 (1) ++	5,93 (1) +	17,98 (1) +++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2	m	8,72 (1) ++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
3	m	n.s.	n.s.	4,19 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	7,43 (1) **		
4	n.s.	9,59 (3) +	n.s.	14,16 (1) +++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
5	m	10,63 (1) ++	4,19 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.	6,52 (1) *	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
7	m	4,44 (1) +	14,4 (3) ++	n.s.	n.s.	n.s.	5,07 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
8	n.s.	n.s.	3,84 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
9	n.s.	10,53 (3) +	n.s.	22,8 (1) +++	12,86 (1) +++	n.s.	9,15 (1) ++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	3,97 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.		
11	6,76 (1) ++	7,43 (1) ++	5,02 (1) +	12,42 (1) +++	7,43 (1) ++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
12	n.s.	16,16 (1) +++	8,36 (1) ++	12,03 (1) +++	4,46 (1) +	n.s.	18,59 (1) +++	n.s.	n.s.	n.s.	4,04 (1) +		
13	n.s.	10,31 (1) ++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
14	n.s.	5,41 (1) +	15,96 (1) +++	9,94 (1) ++	9,33 (1) ++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	18,14 (1) +++	n.s.	3,89 (1) +	5,16 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.		
17	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	9,76 (1) ++	n.s.	n.s.	4,98 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.		
18	n.s.	n.s.	15,86 (3) ++	9,33 (1) ++	15,2 (1) +++	n.s.	5,18 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
22	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	5,97 (1) +	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
23	5,53 (1) +	n.s.	6,49 (1) +	n.s.	11,56 (3) +++	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
24	n.s.	41,8 (3) +++	9,36 (1) ++	5,54 (1) +	n.s.	n.s.	7,93 (1) ++	27,65 (1) ***	n.s.	n.s.	n.s.		
26	n.s.	n.s.	n.s.	5,87 (1) +	15,21 (1) +++	n.s.	n.s.	n.s.	m	n.s.	n.s.		
28	n.s.	n.s.	9,41 (3) *	4,85 (1) *	5,75 (1) +	m	13,84 (1) *	m	m	m	n.s.		
32	m	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		

Примечание. +, ++ и +++ — отклонения от равновесия Харди-Вайнберга достоверны за счет избытка либо *, ** и *** недостатка гетерозигот ($p < 0,05$, $0,01$ и $0,001$ соответственно), n.s. — отклонения недостоверны, m — локус мономорфен.

Таблица 5
Оценка доли ауткроссинга в выборках зародышей
семян клонов плюсовых деревьев архивно-клоновой
плантации *Pinus sylvestris* L.

№ клона	Доля ауткроссинга	
	Однолокус- ная, t_s	Мультилокус- ная, t_m
7	1,027 ± 0,081	0,940 ± 0,004
13	0,525 ± 0,074	0,826 ± 0,090
14	0,673 ± 0,183	0,858 ± 0,066
В среднем	0,729 ± 0,071	0,872 ± 0,037
1	0,718 ± 0,075	0,817 ± 0,055
10	1,388 ± 0,171	1,235 ± 0,025
11	0,887 ± 0,115	0,967 ± 0,004
22	1,110 ± 0,059	1,024 ± 0,043
24	0,972 ± 0,104	1,063 ± 0,007
В среднем	0,949 ± 0,050	0,990 ± 0,015
2	0,766 ± 0,056	0,966 ± 0,071
5	0,874 ± 0,088	0,988 ± 0,105
18	1,248 ± 0,069	1,039 ± 0,090
28	1,110 ± 0,087	1,046 ± 0,070
В среднем	1,019 ± 0,038	1,013 ± 0,043
3	0,526 ± 0,087	0,692 ± 0,102
4	0,730 ± 0,059	0,855 ± 0,067
12	1,054 ± 0,100	0,942 ± 0,071
16	0,935 ± 0,128	1,016 ± 0,073
17	0,768 ± 0,077	0,826 ± 0,081
23	0,999 ± 0,088	0,978 ± 0,006
26	0,967 ± 0,019	0,997 ± 0,020
В среднем	0,868 ± 0,032	0,909 ± 0,026
8	0,907 ± 0,031	1,001 ± 0,069
9	0,775 ± 0,054	0,974 ± 0,018
32	0,745 ± 0,114	0,937 ± 0,018
В среднем	0,793 ± 0,043	0,972 ± 0,025
6	0,956 ± 0,051	1,084 ± 0,032
Средняя по совокупности	0,884 ± 0,020	0,951 ± 0,013
Материнские растения	0,789 ± 0,029	0,897 ± 0,023

выявлены у 11–19 клонов по локусам Dia-1, Fdh, Got-1, Got-2, Got-3, у 7–10 клонов такие отличия установлены по локусам Gdh, Mdh-3, Asp и только по локусам Lap-1 и Lap-2 этих отличий не было вовсе. Семенное потомство всех клонов имело достоверные отличия в частотах аллелей 2–8 локусов по сравнению с частотами аллелей общей выборки клонов. По двум локусам такие отличия имели 5 клонов, по 3–4 локусам – 7 клонов, по 5–6 локусам – 7 клонов и по 7–8 локусам – 4 клона. Все это

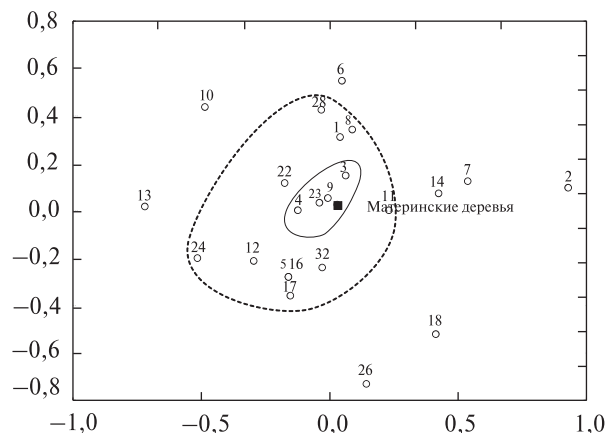
свидетельствует о явной неоднородности генетической структуры семенного потомства отдельных клонов в сравнении с общей выборкой клонов.

Уровень гетерозиготности клонов не является определяющим в гетерозиготности их семенного потомства (табл. 3). Так, например, средняя наблюдаемая гетерозиготность зародышей (H_0) у гетерозиготного по одному локусу растения (№ 7) была существенно выше, нежели у зародышей растения с шестью гетерозиготными локусами. Средний уровень наблюдаемой гетерозиготности зародышей семян исследуемых клонов варьировал в пределах 0,194–0,440, составив для общей их совокупности 0,313. Средняя гетерозиготность клонов была существенно выше – 0,387. Из выделенных групп клонов наиболее низкий средний уровень гетерозиготности их зародышей был свойствен двум группам клонов, гетерозиготных по 1–3 изоферментным локусам. Наибольший уровень средней гетерозиготности зародышей отмечен у группы клонов, у которых гетерозиготны 5 локусов. Наименьшая гетерозиготность зародышей ($H_0 = 0,194–0,249$) установлена у отдельных средне- и высокогетерозиготных клонов. Превышение средней гетерозиготности зародышей над гетерозиготностью клонов выявлено только у 8 клонов, гетерозиготных по 1–3 локусам. Для всех выделенных групп клонов, как и в целом для их совокупной выборки, характерно превышение наблюдаемой над ожидаемой гетерозиготностью. Это указывает на то, что у зародышей семян клонов имеется некоторый избыток гетерозигот. Согласно средним значениям коэффициента инбридинга особи относительно выборки (F_{IS}) избыток гетерозигот у зародышей семян отдельных клонов составлял 0,9–32,4 %. Только в выборках зародышей клонов № 26 и № 28 имеется недостаток гетерозигот. Для зародышей семян природных популяций хвойных Украины, как, например, сосны крымской, сосны меловой (*Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom.), пихты белой (*Abies alba* Mill.) и ели европейской, наоборот, характерен недостаток гетерозигот [17, 18]. Более низкий средний уровень гетерозиготности в выборках зародышей 15 клонов в сравнении с самими клонами указывает на то, что в их семенном потомстве

присутствуют генотипы, которые в природных популяциях отсекаются естественным отбором.

У зародышей семян клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* выявлен 61 случай существенного отклонения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга (табл. 4). Только у двух клонов (№ 6 и 32) не отмечено неравновесного распределения генотипов зародышей ни по одному из анализируемых локусов. В выборках зародышей семян остальных клонов таких локусов было от 1 до 6. Максимальное количество неравновесных распределений генотипов в выборках зародышей приходилось на высокополиморфные локусы — Dia-1, Gdh, Got-2, Got-3 и Mdh-3. В 56 случаях это неравновесие у зародышей семян клонов было связано с избытком и только в 5 случаях с недостатком гетерозигот. Высокая встречаемость случаев существенного отклонения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга отмечена у зародышей семян растений природных популяций многих видов хвойных [21–23].

При анализе генетических особенностей семенного потомства селекционно-перспективных растений важно выяснить систему их скрещивания, а точнее долю потомства, полученного от само- и перекрестного опыления [6]. У ряда клонов доля перекрестного опыления была более 1 (табл. 5). Такие оценки могут быть получены, когда гетерозиготность зародышей семян выше, чем ожидаемая при 100%-ном перекрестном опылении, при отрицательном ассортативном скрещивании [24] или при наличии неравновесия по сцеплению, обуславливающего комбинации аллелей, которые соответствуют более чем 100%-ному перекрестному опылению [14]. В целом, семенное потомство клонов плюсовых деревьев в архивно-клоновой плантации *P. sylvestris* получено от высокой доли перекрестного опыления. Согласно средним значениям однолокусной оценки (t_s) доля ауткроссинга составила 0,884, а мультилокусной (t_m) — 0,951. Это выше, чем в совокупной выборке самих клонов. Среди клонов встречаются только два (№ 5 и 13), у которых доля ауткроссинга (t_s) существенно меньше средней по всей



Расположение выборок зародышей семян клонов плюсовых деревьев в пространстве двух первых главных компонент (по горизонтали — компонента I, по вертикали — компонента II), полученных методом многомерного шкалирования данных по аллельному составу 10 полиморфных изоферментных локусов

их совокупности. Семенное потомство низко- и высокогетерозиготных групп клонов имеет высокую долю ауткроссинга.

При многомерном шкалировании выборок зародышей семян клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* по аллельным частотам 10 полиморфных локусов методом главных компонент наглядно обнаруживается разная степень обособленности семенного потомства клонов друг к другу и по отношению к материнским деревьям (рисунок). Можно выделить группу клонов, семенное потомство которых характеризовалось близостью к их совокупной выборке (№ 3, 4, 9, 23), средней удаленностью (№ 1, 5, 8, 11, 12, 16, 17, 22, 28, 32) и заметной удаленностью (№ 2, 6, 7, 10, 13, 14, 18, 24, 26, 28).

Создание клоновых семенных плантаций плюсовых деревьев — первый шаг в домостификации ценных для лесного хозяйства видов. При этом предполагается, что качество семян с этих плантаций будет выше, чем природных древостоев. Важной целью при создании лесосеменных плантаций является сохранение естественного пула генов, свойственного природным популяциям вида. По этой причине при отборе плюсовых деревьев для создания клоновой лесосеменной плантации важно знать их генотипические

особенности. Очевидно, клоны должны иметь низкую степень гетерозиготности, что обеспечит снижение генетического груза, связанного с присутствием у гетерозигот рецессивных (суб)летальных аллелей по ряду локусов [6]. В изучаемой нами выборке клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* около половины (11 растений) относятся к высокогетерозиготным. По мнению ряда авторов, у таких растений может образовываться избыточное количество пустых и нежизнеспособных семян [6, 10]. Наши исследования, проведенные с другими видами хвойных, показывают, что это не всегда так [25]. В любом случае у плюсовых деревьев должен проводиться предварительный анализ на наличие избыточной пустоосемянности перед использованием их для формирования клоновых семенных плантаций. Этот анализ и данные аллозимной изменчивости — необходимая основа подбора плюсовых деревьев этих плантаций, что и обеспечит получение семян с генетически улучшенным качеством.

Таким образом, большая часть клонов в архивно-клоновой плантации плюсовых деревьев *P. sylvestris* характеризовалась высокой гетерозиготностью и встречаемостью существенных нарушений сегрегации аллелей в мегагаметофитах семян. Семенное потомство большинства клонов имело меньший уровень гетерозиготности, чем сами материнские растения. Кроме того, для зародышей семян характерна высокая частота встречаемости существенных отклонений в фактическом распределении генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга. Генетическая структура зародышей семян отдельных клонов имела заметные отличия в сравнении с генетической структурой объединенной выборки исходных плюсовых деревьев. По этим причинам теоретически ожидаемое селективное преимущество семян изучаемой группы клонов архивно-клоновой плантации *P. sylvestris* может быть и не столь высоким, как изначально предполагалось.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднику УкрНИИЛХ им. Высоцкого Ларисе Ивановне Терещенко за предоставленный для анализа семенной материал.

I.I. Korshikov, A.Ye. Demkovich
 GENETIC POLYMORPHISM OF PLUS-TREE CLONES AND THEIR SEED PROGENY IN THE SCOTCH PINE CLONE PLANTATION

Genetic variation at 12 allozyme loci (10 of them being polymorphic ones) has been studied in the archive-clone plantation of 23 *Pinus sylvestris* plus-trees and their seed progeny in the south-east of Ukraine. More than a half of clones had 4–8 heterozygous loci, whereas their seed progeny was marked by a lower variation than maternal trees. Seed progeny was obtained at a high outcrossing rate ($t_m = 95\%$). The clone progeny was characterized by a high percentage of abnormal allele segregation in megagametophytes. There was also a high frequency of significant deviation in distribution of seed embryo genotypes from the theoretically expected one according to the Hardy-Weinberg law.

I.I. Коршиков, А.Е. Демкович
 ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ КЛОНІВ ТА ЇХ НАСІННЕВОГО ПОТОМСТВА В АРХІВНО-КЛОНОВІЙ ПЛАНТАЦІЇ ПЛЮСОВИХ ДЕРЕВ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Досліджено генетичну мінливість за 12 алозимними локусами (10 поліморфних) архівно-клонової плантації 23 плюсових дерев *Pinus sylvestris* L. та їх насінневого потомства на південному сході України. Понад половина клонів мали 4–8 гетерозиготних локусів, а їх насіннєве потомство відрізнялося нижчим рівнем мінливості, ніж материнські рослини. Насіннєве потомство отримано від високої частки ауткросинга ($t_m = 95\%$). Для потомства клонів характерна підвищена частка порушень сегрегації алелів у мегагаметофитах і висока частота відхилень розподілу генотипів зародків насіння від очікуваного згідно з законом Харді-Вайнберга.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Молотков П.И., Патлай И.Н., Давыдова Н.И. и др. Селекция лесных пород. — М.: Лесн. пром-сть, 1982. — 224 с.
2. Яцик Р.М., Дейлека А.М., Парпан В.І. та ін. Лісові генетичні ресурси та селекційно-насінницькі об'єкти Львівщини. — Івано-Франківськ, 2006. — 312 с.
3. Тараканов В.В., Демиденко В.П., Ишутин Я.Н. и др. Селекционное семеноводство сосны обыкновенной в Сибири. — Новосибирск : Наука, 2001. — 230 с.
4. Ефимов Ю.П. Проблемы повышения эффективности лесосеменных плантаций // Генетика и селекция в лесоводстве / Воронеж. ЦНИИЛГиС. — М., 1991. — С. 198–213.
5. Исаков Ю.Н. Эколого-генетическая изменчивость

- и селекция сосны обыкновенной : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб, 1999. — 36 с.
6. Hosius B., Bergmann F., Konnert M., Henkel W. A concept for seed orchards based on isoenzyme gene markers // *Forest Ecol. and Manag.* — 2000. — **131**. — P. 143–152.
 7. Милютин Л.И. Генетико-эволюционные основы устойчивости лесных экосистем // *Лесоведение*. — 2003. — № 1. — С. 16–20.
 8. Шуганов З.Х. Генетический анализ природных популяций и лесосеменных плантаций сосны обыкновенной : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Красноярск, 1993. — 23 с.
 9. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. — 431 с.
 10. Алтухов Ю.П., Гафаров Н.И., Крутовский К.В. и др. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). Сообщ. 3. Корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и относительным количеством нежизнеспособных семян // *Генетика*. — 1986. — **22**, № 12. — С. 2825–2830.
 11. Davis B.J. Disk electrophoresis. 2. Methods and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1964. — **121**. — P. 404–427.
 12. Коршиков И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. — К.: Наук. думка, 1996. — 272 с.
 13. Wright S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating // *Evolution*. — 1969. — **9**. — P. 395–420.
 14. Ritland K. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci // *Heredity*. — 2002. — **88**. — P. 221–228.
 15. 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.
 16. Peakall R., Smouse P.E. 2005. GenA1Ex V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. Available via <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenA1Ex>.
 17. Демкович А.Е. Программа GenRes для анализа данных популяционно-генетических исследований хвойных // *Промышл. ботаника*. — 2007. — Вып. 7. — С. 33–36.
 18. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской). — Донецк : ООО «Лебедь», 2002. — 328 с.
 19. Cheliak W.M., Morgan K., Dancik B. et al. Segregation of allozymes in megagametophytes of viable seeds from a natural population of jack pine, *Pinus banksiana* Lamb. // *Theor. Appl. Genet.* — 1984. — **69**, № 2. — P. 145–151.
 20. Korshikov I.I., Pirko N.N., Mudrik E.A. et al. Maintenance of genetic structure in progenies of marginal mountainous and steppe Populations of three species of Pinaceae Lindl. family in Ukraine // *Sylvae Genet.* — 2007. — **56**, № 1. — P. 1–10.
 21. Приваліхін С.М. Популяційно-генетичне різноманіття ялини європейської (*Picea abies* (L.) Karst.) в Українських Карпатах : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2008. — 21 с.
 22. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. — 619 с.
 23. Мудрик Е.А. Динамика генетической структуры природных популяций некоторых видов семейства *Pinaceae* Lindl. в Украине : Дис. ... канд. биол. наук. — Донецк, 2006. — 200 с.
 24. El-Kassaby Y.A., Meagner M.D., Davidson R., Temporal variation in the outcrossing rate in a natural stand of western white pine // *Sylvae Genet.* — 1993. — **42**, № 2/3. — P. 131–135.
 25. Коршиков И.И., Мудрик Е.А., Терлыга Н.С. Анализ генетической гетерогенности зародышей семян у деревьев с разной семенной продуктивностью в популяции сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) в Крыму // *Цитология и генетика*. — 2005. — **39**, № 2. — С. 27–33.

Поступила 20.08.08