

БАГДАСАРОВА А.Р.¹ ✉, КОРШИКОВ И.И.^{2,3}, КАЛАФАТ Л.А.¹, ПРИВАЛИХИН С.Н.¹, ПІРКО Н.Н.¹, ПАСТУХОВА Н.Л.¹, ПІРКО Я.В.¹

¹ ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,

Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2а, e-mail: popgen.ifbg@gmail.com alla_bagdasarova@mail.ru

² Криворожский ботанический сад НАН Украины,

Украина, 50089, г. Кривой Рог, ул. Маршака, 50

³ Донецкий ботанический сад НАН Украины,

Украина, 50089, г. Кривой Рог, ул. Маршака, 50

✉ popgen.ifbg@gmail.com, alla_bagdasarova@mail.ru, (044) 434-37-77

СВЯЗЬ УРОВНЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ И ПАРАМЕТРОВ РОСТА У *PINUS SYLVESTRIS* L.VAR. *CRETACEA* KALENICZ EX KOM. ЗАПОВЕДНИКА «МЕЛОВАЯ ФЛОРА»

В лесоразведении закладка семенных плантаций обычно основывается на учете морфометрических параметров (диаметр ствола, высота и др.) [1]. Необходимым условием для успешной разработки краткосрочной и долгосрочной стратегий лесоразведения является понимание связи генетических параметров со скоростью роста и продуктивностью насаждений [2].

Открытие белкового полиморфизма позволило генетикам и селекционерам проводить раннюю диагностику проявления наследственных признаков у деревьев с разной интенсивностью роста. Исследования хвойных продемонстрировали существование взаимосвязи между уровнем гетерозиготности и адаптационными возможностями растений за счет существования множественных молекулярных форм ферментов, имеющих различный каталитический оптимум (температура, pH и т.п.) [3]. Поэтому изучение взаимосвязи между гетерозиготностью и рядом количественных признаков у хвойных является актуальной задачей.

Материалы и методы

Объекты исследования – изменчивость изоферментов 9 ферментных систем: глутаматдегидрогеназы (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), кислой фосфатазы (ACP, К.Ф. 3.1.3.2), глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К.Ф. 2.6.1.1), супероксиддисмутазы (SOD, К.Ф. 1.15.1.1), малатдегидрогеназы (MDH, К.Ф. 1.1.1.37), лейцинаминопептидазы (LAP, К.Ф. 3.4.11.1), формиатдегидрогеназы (FDH, К.Ф. 1.2.1.2), диафотазы (DIA, К.Ф. 1.6.4.3), алкогольдегидроге-

назы (ADH, К.Ф. 1.1.1.1) у *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom.

Репрезентативная выборка растений составила 110 деревьев из 7 локальностей природной популяции *P. sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom. заповедника «Меловая флора» (рис.). На основе данных по лесной таксации деревья были объединены в два класса возраста (табл. 1). Деревья в каждом из классов разделили на две группы в зависимости от диаметра ствола: первая – деревья с меньшим диаметром, вторая – деревья с большим диаметром.

Для электрофоретического исследования использовали изоферменты вегетативных почек, собранные с отдельных деревьев в период покоя. Для выделения ферментов ткань почек гомогенизировали в 100 мкл экстрагирующего буфера, приготовленного по методике [4] с некоторыми модификациями. Электрофоретическое разделение изоферментов и последующее гистохимическое окрашивание гелей проводили по стандартным методикам [5]. Обозначение аллелей проводили согласно общепринятой номенклатуре Пракаша [6]. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета компьютерных программ GenAlex [7].

Результаты и обсуждение

Имеющиеся в литературе данные относительно связи гетерозиготности и количественных признаков весьма противоречивы. Как показали ранее проведенные исследования, увеличение продуктивности растений часто ассоциируется с уровнем их гетерозиготности [8]. Для *P. sylvestris* связь между гетерозиготностью по 12 аллозим-



Рис. Расположение выборок *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom. заповедника «Меловая флора»

ным локусам и шестью количественными признаками с использованием различных статистических методов не было выявлено [9]. Если такие ассоциации возникают, то только у отдельных гетерозисных растений. Позитивная корреляция между годичным радиальным приростом и уровнем гетерозиготности по 14 полиморфным аллозимным локусам у клонов (*Populus tremaloides* Michx.) была установлена только в случае разделения клонов по классам гетерозиготности [10]. В отдельных исследованиях установлена положительная связь между гетерозиготностью и скоростью роста в отдельных популяциях древесных растений или их групп [8, 10]. Однако связь между гетерозиготностью и ростом растений не является универсальной. Так, с помощью RFLP-анализа для гибридов второго поколения *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* не было выявлено корреляции между морфометрическими параметрами и гетерозиготностью [11].

В проведенных нами исследованиях уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_0) для деревьев с большим диаметром ствола оказался выше,

в сравнении с деревьями с меньшим диаметром ствола в трех локальностях («Широкий яр», «Беловодка» и «Локальность 3»). Для остальных четырех – наблюдалась противоположная тенденция (табл. 1). С учетом возраста этих древостоев можно отметить, что уровень наблюдаемой гетерозиготности деревьев с большим диаметром ствола был выше у более зрелых деревьев («Широкий яр» и «Беловодка»), за исключением деревьев в насаждении «Ракушечный яр». Для более молодых деревьев наблюдается обратная тенденция, за исключением древостоя «Локальность 3». В целом, возрастание уровня гетерозиготности с возрастом, характерное для большинства видов хвойных, обусловлено элиминацией инбредного потомства, а также балансирующим отбором в пользу гетерозигот, который является ключевым фактором в поддержании полиморфизма популяции [12].

Во всех локальностях (за исключением «Беловодка») наблюдается избыток гетерозиготных генотипов, который составил от 5,8 до 30% (табл. 1). При анализе объединенных выборок деревьев с большим и меньшим диаметром ство-

Таблица 1

Значения основных показателей генетического полиморфизма, рассчитанных на основании анализа 20 аллозимных локусов, в выборках растений *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom. различного класса возраста, различающихся по диаметру ствола, заповедника «Меловая флора»

| Группа деревьев по диаметру ствола | Доля полиморфных локусов, P ₉₉ | Среднее число аллелей, A | Средняя гетерозиготность, M±m | | Индекс фиксации Райта, F |
|---|---|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | | | ожидаемая, H _E | наблюдаемая, H _O | |
| Ракушечный яр (61–80 лет, приспевающие) | | | | | |
| 1 | 55,00 | 1,600 | 0,160±0,039 | 0,208±0,054 | -0,300 |
| 2 | 60,00 | 1,750 | 0,177±0,042 | 0,193±0,051 | -0,090 |
| Беловодка (61–80 лет, приспевающие) | | | | | |
| 1 | 55,00 | 1,750 | 0,188±0,044 | 0,208±0,070 | -0,106 |
| 2 | 60,00 | 1,750 | 0,208±0,043 | 0,229±0,051 | 0,092 |
| Широкий яр (61–80 лет, приспевающие) | | | | | |
| 1 | 50,00 | 1,700 | 0,130±0,038 | 0,150±0,052 | -0,154 |
| 2 | 60,00 | 1,750 | 0,188±0,041 | 0,221±0,056 | -0,176 |
| Локальность 1 (до 20 лет, молодняки) | | | | | |
| 1 | 50,00 | 1,650 | 0,172±0,046 | 0,183±0,051 | -0,064 |
| 2 | 40,00 | 1,450 | 0,155±0,047 | 0,164±0,058 | -0,058 |
| Локальность 2 (до 20 лет, молодняки) | | | | | |
| 1 | 55,00 | 1,700 | 0,190±0,042 | 0,220±0,054 | -0,158 |
| 2 | 50,00 | 1,650 | 0,155±0,042 | 0,178±0,049 | -0,148 |
| Локальность 3 (до 20 лет, молодняки) | | | | | |
| 1 | 60,00 | 1,650 | 0,167±0,039 | 0,179±0,046 | -0,072 |
| 2 | 60,00 | 1,700 | 0,184±0,044 | 0,200±0,049 | -0,087 |
| Локальность 4 (до 20 лет, молодняки) | | | | | |
| 1 | 60,00 | 1,750 | 0,169±0,040 | 0,183±0,043 | -0,083 |
| 2 | 40,00 | 1,400 | 0,134±0,042 | 0,160±0,052 | -0,194 |
| Деревья с меньшим диаметром ствола (группа 1) | | | | | |
| 1 | 70,00 | 2,250 | 0,186±0,039 | 0,188±0,040 | -0,011 |
| Деревья с большим диаметром ствола (группа 2) | | | | | |
| 2 | 75,00 | 2,220 | 0,192±0,038 | 0,196±0,040 | -0,021 |

ла видно, что уровень наблюдаемой гетерозиготности у группы деревьев с большим диаметром ствола выше, чем у группы деревьев с меньшим диаметром. Избыток гетерозиготных генотипов в этих группах составил 2,1 и 1,1 %, соответственно. Однако эти различия статистически недостоверны. Также в приспевающих выборках деревьев отмечен несколько больший уровень ожидаемой гетерозиготности (H_E) в группах деревьев с большим диаметром ствола. Следовательно, пока лишь можно говорить о тенденции увеличения уровня гетерозиготности у деревьев с большим диаметром ствола и такой показатель, как величина наблюдаемой гетерозиготности для выявления в насаждении деревьев с большим диаметром ствола, оказался малоинформативным.

Ранее у плюсовых и случайных деревьев *Pinus sylvestris* (L.) Karst. [13] при разделении аллозимных маркеров на группы в зависимости от их значимости в метаболизме растений, обнаружена значительная разница в локусах, относящихся к основным и побочным метаболическим путям. Так, например, по среднему уровню и распределению индивидуальной гетерозиготности плюсовые и случайные деревья ели европейской отличались от случайных деревьев популяций по трем локусам, контролирующим ферменты пентозофосфатного цикла. В исследованиях с *P. sylvestris* нам также удалось установить, что объединенные группы деревьев с меньшим и большим диаметром ствола значительно разли-

чаются по уровню гетерозиготности отдельных ферментных локусов (табл. 2).

Для объединенных групп деревьев сравнение величин средней наблюдаемой гетерозиготности по отдельным ферментным локусам (табл. 2) показало, что гетерозиготность деревьев с большим диаметром ствола по локусам Lap-1 и Dia-2 была в 1,6 и 1,7 раз выше, чем у деревьев с меньшим диаметром ствола. Наиболее существенно величина средней наблюдаемой гетерозиготности у деревьев с большим диаметром ствола отличалась по локусу Mdh-2 (в 6,6 раз). А по локусам Got-3 и Fdh гетерозиготность деревьев с меньшим диаметром ствола была выше в 1,4 и 3 раза соответственно.

Однако, при сопоставлении уровня наблюдаемой гетерозиготности для отдельных насаждений видно, что по выделенным выше локусам у деревьев с большим диаметром ствола H_o выше в четырех (локус Lap-1) и трех (локус Dia-2) локальностях из семи. Для деревьев с меньшим диаметром ствола по локусу Got-3 H_o была выше в пяти локальностях из семи. Причем, для деревьев локальности «Широкий яр» значения H_o были одинаковыми для деревьев с большим и меньшим диаметром ствола, а для «Локальность 1» для деревьев с большим диаметром ствола были больше в 3,4 раза. По локусу Fdh гетерозиготность деревьев с меньшим диа-

метром ствола была выше в трех локальностях из семи. Причем в двух локальностях гетерозиготность деревьев с большим диаметром ствола была выше, чем гетерозиготность деревьев с меньшим диаметром. Таким образом, сравнение объединенных групп деревьев по средней наблюдаемой гетерозиготности может приводить к ошибочным суждениям вследствие неодинаковой тенденции в изменении гетерозиготности деревьев в различных насаждениях и неодинакового их вклада в результирующий уровень гетерозиготности. Только по локусу Mdh-2 прослеживается одинаковая тенденция к увеличению уровня гетерозиготности у деревьев с большим диаметром ствола, однако этот локус не подходит в качестве маркерного из-за его невысокой полиморфности.

Генетически деревья с большим и меньшим диаметром ствола мало отличаются друг от друга, о чем свидетельствуют значения генетической дистанции Нея (D_N). D_N между группами деревьев с большим и меньшим диаметром ствола находилась в пределах 0,007 («Широкий яр») – 0,022 («Ракушечный яр»). Однако D_N между объединенными группами деревьев с большим и меньшим диаметром ствола составляла лишь 0,002.

Также было проведено исследование общей гетерогенности частот аллелей и генотипов у групп деревьев с большим и меньшим диаметром

Таблица 2

Средняя наблюдаемая гетерозиготность, рассчитанная для 12 полиморфных локусов, в выборке *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom. с меньшим и большим диаметром ствола заповедника «Меловая флора»

| Локусы | Средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_o) | | |
|--------|--|---|----------------------------------|
| | деревья с меньшим диаметром ствола (группа 1) | деревья с большим диаметром ствола (группа 2) | В целом для объединенной выборки |
| Gdh | 0,364 | 0,382 | 0,373 |
| Got-1 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Got-2 | 0,491 | 0,564 | 0,527 |
| Got-3 | 0,418 | 0,291 | 0,355 |
| Mdh-2 | 0,036 | 0,236 | 0,136 |
| Mdh-3 | 0,455 | 0,436 | 0,445 |
| Acp-1 | 0,382 | 0,455 | 0,418 |
| Acp-2 | 0,164 | 0,127 | 0,145 |
| Lap-1 | 0,164 | 0,255 | 0,209 |
| Lap-2 | 0,182 | 0,182 | 0,182 |
| Fdh | 0,218 | 0,073 | 0,145 |
| Adh-1 | 0,273 | 0,236 | 0,255 |
| Adh-2 | 0,091 | 0,091 | 0,091 |
| Dia-1 | 0,418 | 0,382 | 0,400 |
| Dia-2 | 0,109 | 0,182 | 0,145 |
| Dia-4 | 0,000 | 0,036 | 0,018 |

ствола у *P. sylvestris* с помощью модифицированного с2-теста (GenRes) для 16 локусов. Наиболее значимыми оказались различия групп деревьев с большим и меньшим диаметром ствола по локусам Mdh-2 (10,835 (2) **), Lap-2 (10,593 (3) *) и Fdh (8,088 (2) *), по остальным локусам различия были не существенными.

Выводы

Таким образом, в генетической структуре групп деревьев *P. sylvestris*, различающихся по диаметру ствола, характерных отличий не обна-

ружено. Тем не менее, наблюдается тенденция увеличения гетерозиготности в группе более зрелых деревьев с большим диаметром ствола по сравнению с деревьями с меньшим диаметром. Для молодых деревьев наблюдается обратная зависимость. Наиболее существенно деревья с большим и меньшим диаметром отличались по локусам Mdh-2, Lap-2 и Fdh. Для всех насаждений найдены отличия наблюдаемой гетерозиготности между деревьями с большим и меньшим диаметром по локусу Mdh-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gaspar M.J., Louzada J.L., Aguiar A., Helena M.F. Genetic correlations between wood quality traits of *Pinus pinaster* Ait. // Ann. For. Sci. – 2008. – 65. – P. 703.
2. Kroon J. Spatiotemporal patterns of genetic variation for growth and fertility in Scots pine: doctoral thesis Swedish University of agricultural sciences. – Umeå, 2011. – 59 p.
3. Ledig F.T. The conservation of diversity in forest trees // Bioscience. – 1988. – 38. – P. 471–479.
4. Молотков П.И. Селекция лесных пород. – М: Лесная промышленность, 1982. – 221 с.
5. Davis B.J. Disk electrophoresis. II. Methods and applications to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – 121. – P. 67–75.
6. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby T.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. 4. Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics (USA). – 1969. – 61. – P. 841–858.
7. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. – 2006. – 6. – P. 288–295.
8. Mitton J.B., Grant M.C. Association among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis // Annual Review of Ecology and Systematic. – 1984. – 15. – P. 479–499.
9. Savolainen O., Hedrick P. Heterozygosity and fitness: no association in Scotpine // Genetics. – 1995. – 140, № 2. – P. 755–766.
10. Jelinski D.E. Associations between environmental heterogeneity, heterozygosity, and growth rates of *Populus tremuloides* in a Cordilleran landscape // Arctic and Alpine Research. – 1993. – 25. – P. 183–188.
11. Bradshaw H.D., Stettled R.F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree // Genetics. – 1995. – 139. – P. 963–973.
12. Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Политов Д.В. Система скрещивания и динамика аллозимной гетерозиготности в популяциях кедрового сланика, *Pinus pumila* (Pall.) Regel // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – XXVII, № 1–2. – P. 13–17.
13. Bergmann F., Ruetz W. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations // Forest Ecology and Management. – 1991. – 46. – P. 39–47.

BAGDASAROVA A.R.¹, KORSHIKOV I.I.^{2,3}, KALAFAT L.A.¹, PRIVALIKHIN S.N.¹, PIRKO N.N.¹, PASTUKHOVA N.L.¹, PIRKO YA.V.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,

Ukraine, 04123, Kiev, **Osipovskogo str., 2A**, e-mail: popgen.ifbg@gmail.com, alla_bagdasarova@mail.ru

² Kryvov Rog Botanical Garden of National Academy of Sciences of Ukraine,

Ukraine, 50089, Krivoy Rog, **Marshak str., 50**

³ Donetsk Botanical Garden of National Academy of Sciences of Ukraine,

Ukraine, 50089, Krivoy Rog, **Marshak str., 50**

HETEROZYGOSITY LEVEL AND GROWTH PARAMETERS OF *PINUS SYLVESTRIS* L.VAR. *CRETACEA* KALENICZ EX COM. IN «MELOVAYA FLORA» NATURE RESERVE

Aim. The genetic characteristics of *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom. trees with different stem diameter was studied. **Methods.** The heterozygosity of trees with significant differences in the radial growth rates from 7 localities of the «Melovaya flora» nature reserve using isozymes of 9 gene-enzyme systems were investigated. **Results.** There were no significant differences in the level of the observed heterozygosity among trees with different trunk diameters. We observed the trend of higher heterozygosity in mature trees with greater stem diameter and the reverse effect in young trees. **Conclusions.** The differences between trees with greater and smaller stem diameters were most sensible at loci Mdh-2, Lap-2 and Fdh. Different values of the observed heterozygosity at Mdh-2 locus were detected in greater and smaller diameter trees from all localities.

Keywords: *Pinus sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz ex Kom., isoenzymes, heterozygosity.