

УДК 575.1:582.475.4:434.0.2.232

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ *PINUS SYLVESTRIS* L. И ИХ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

А.Е. ДЕМКОВИЧ<sup>1</sup>, И.И. КОРШИКОВ<sup>1</sup>, Д.В. ПОЛИТОВ<sup>2</sup>, Е.А. МУДРИК<sup>2</sup>, С.А. ЛОСЬ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Донецкий ботанический сад Национальной академии наук Украины  
83059 Донецк, просп. Ильича, 110  
e-mail: dbsgenetics@gmail.com

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук»  
119333 Москва, ул. Губкина, 3

<sup>3</sup>Украинский ордена «Знак Почета» научно-исследовательский институт лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.Н. Высоцкого  
61024 Харьков, ул. Пушкинская, 86

Изучен генетический полиморфизм 26 плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. украинской селекции по микросателлитным локусам *Pttx2146* и *Spac11.8*, а также семенного потомства 11 деревьев. В общей выборке деревьев выявлено по 7 аллелей каждого локуса, тогда как у семенного потомства их было 10 и 11. Средняя наблюдаемая гетерозиготность ( $H_o$ ) по локусу *Pttx2146* у плюсовых деревьев была 0,800, у потомства — 0,736, по локусу *Spac11.8* — заметно ниже (соответственно 0,280 и 0,495). По этому локусу плюсовым деревьям свойствен недостаток гетерозигот 43,5, потомству — 62,2 %, по локусу *Pttx2146* — избыток 21,0 и 5,0 %. Генетический коэффициент подобия Жаккара каждого плюсового дерева и его семенного потомства варьировал от 0,183 до 0,530 и для совокупной выборки 95 потомков составлял 0,170, для 26 деревьев — 0,203.

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris* L., SSR, генетическая изменчивость, плюсовые деревья, семенное потомство.

В 1980-е годы наиболее перспективным методом селекции лесных древесных растений считалась плюсовая, т.е. отбор, как правило, в природных популяциях растений, которые минимум на 25 % превосходили остальные по показателям роста. Схема селекционной работы с плюсовыми деревьями предусматривала создание их архивно-клоновых плантаций, которые затем использовались для формирования клоновых семенных плантаций. Стабильность воспроизводства превосходящих ростовых показателей плюсовых деревьев в их семенном потомстве оценивают в испытательных культурах. Результаты этих многолетних научно-практических изысканий показали, что очень часто семенное потомство плюсовых деревьев не наследует способность родительских форм к более интенсивному росту [6]. В Украине — одной из первых республик СССР — во второй половине XX ст. начали создавать архивно-клоновые плантации лесных древесных растений [9], в частности, сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) [5]. Следует отметить, что это дорогое и трудоемкое селекционное направление осуществляется в нашей стране без

использования современных методов генетики, позволяющих уже на ранних этапах выяснить генетическое сходство и отличия плюсовых деревьев и их потомства.

Для быстрой молекулярно-генетической диагностики растений активно применяют ДНК-маркеры, в частности, микросателлитные локусы. Они локализованы в некодирующей части генома, как правило, селективно нейтральны, однако возможно их тесное сцепление с какими-либо адаптивно значимыми генами, а также они ассоциированы с локусами количественных хозяйственно ценных признаков. С помощью микросателлитов нередко выявляют гетерозиготность популяций растений в тех случаях, когда она не прослеживается при анализе изменчивости аллозимных локусов. По мнению Алтухова [2], это может быть объяснено тем, что ряд видов или отдельные популяции прошли через «бутылочное горлышко» и восстановление их генетической изменчивости значительно быстрее происходит по микросателлитным локусам благодаря высокой скорости мутирования. Огромная изменчивость микросателлитов позволяет без проблем выяснять степень родства между растениями и их потомками [4]. Оценку генетической изменчивости плюсовых деревьев по ДНК-маркерам в архивно-клоновых коллекциях и их потомства в Украине никто не проводил.

Цель работы — анализ генетической изменчивости по двум ядерным микросателлитным локусам 26 плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* и семенного потомства 11 из них.

### Методика

Исследование генетической изменчивости по двум микросателлитным локусам *Pttx2146* и *Spac11.8* проводили с 26 плюсовыми деревьями на архивно-клоновой плантации, заложенной Украинским научно-исследовательским институтом лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.Н. Высоцкого (УКРНИИЛХ) в Задонецком лесничестве. Выясняли также генетическое сходство и различия у семенного потомства 11 этих деревьев в испытательных культурах (всего 95 растений). ДНК выделяли из вегетативных почек или хвои с помощью набора «Diatom DNA Prep» (ООО «Лаборатория Изоген»). Для сорбции фенольных соединений к каждому образцу (5–10 мг ткани) добавляли 25 мкл 7 %-го раствора поливинилпирролидона «К90» (AppliChem). Олигонуклеотидные праймеры к двум высокоизменчивым SSR-локусам (*Pttx2146*, температура отжига  $T_o = 57\text{ }^\circ\text{C}$  и *Spac11.8*,  $T_o = 51\text{ }^\circ\text{C}$ ) были подобраны согласно литературным данным [14, 18]. Синтез олигонуклеотидов на автоматическом синтезаторе нуклеиновых кислот (Applied Biosystems) был осуществлен фирмой «Бигль» (Россия). Амплификацию SSR-локусов проводили с использованием набора «GenePak PCR Core» (фирма «Изоген», Россия). ПЦР осуществляли на приборе «GeneAmp PCR System 2400» («Perkin Elmer»). Температурный режим ПЦР был следующим: 94 °C 4 мин; 25 циклов: 94 °C 1 мин,  $T_o$  45 с, 72 °C 45 с; 72 °C 7 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу при 10 В/см в вертикальном полиакриламидном 6 %-м неденатурирующем геле [8] размером 1,5×200×200 мм, буфер ТВЕ 1×. Использовали маркер молекулярной массы PBR322/MSP I. Окрашивали электрофореграммы с помощью бромистого этидия [8] либо нитрата серебра [12] (рис. 1, 2).

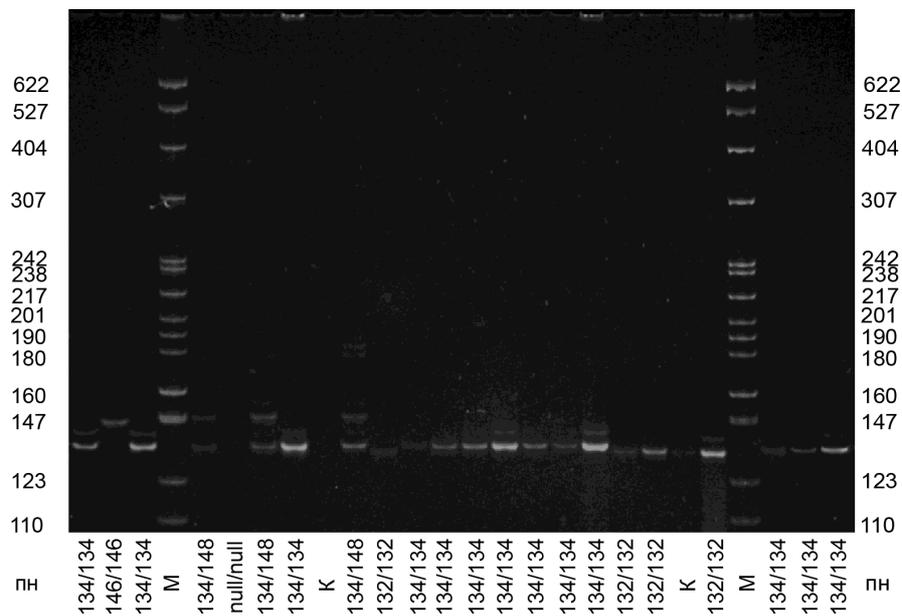


Рис. 1. Ампликоны, окрашенные бромистым этидием (локус *Spac11.8*)

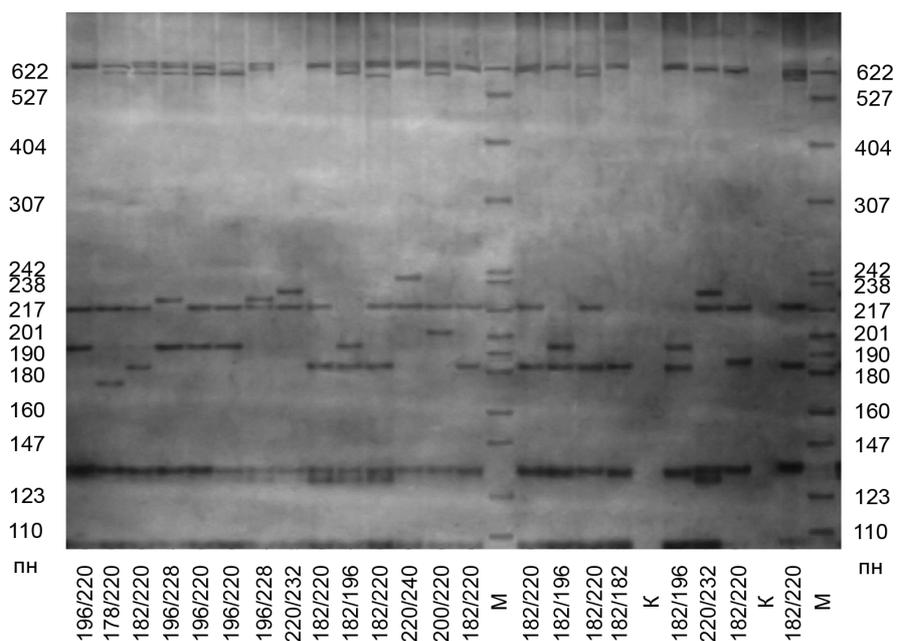


Рис. 2. Ампликоны, окрашенные нитратом серебра (локус *Ptx2146*)

### Результаты и обсуждение

В выборке 26 плюсовых деревьев *P. sylvestris* по локусу *Ptx2146* наиболее часто встречался (0,520) аллель 220 (табл. 1), который можно рассматривать как преобладающий. У 95 потомков 11 плюсовых деревьев средняя встречаемость этого аллеля составила 0,460. С частотой  $\geq 0,500$  он выявлен только у потомства 6 деревьев, у потомства дерева № 25 преоблада-





ТАБЛИЦА 2. Значение основных показателей генетического полиморфизма по двум микросателлитным локусам для семенного потомства II клонированных деревьев *Pinus sylvestris* L.

Выборка, номер плюсового дерева	Объем выборки	Локус	Количество		Средняя гетерозиготность		Индекс фиксации Райта (F)
			аллелей	генотипов	H <sub>0</sub>	H <sub>E</sub>	
И-10	9	<i>Ptx2146</i>	5	3	0,778	0,673	-0,156
И-12	8	<i>Srac11.8</i>	3	7	0,429	0,357	-0,200
		<i>Ptx2146</i>	4	4	0,571	0,541	-0,057
И-13	7	<i>Srac11.8</i>	4	4	0,375	0,492	0,238
		<i>Ptx2146</i>	4	4	0,667	0,653	-0,021
И-16	9	<i>Srac11.8</i>	4	4	0,667	0,514	-0,297
		<i>Ptx2146</i>	6	3	0,889	0,704	-0,263
И-25	10	<i>Srac11.8</i>	3	7	0,571	0,449	-0,273
		<i>Ptx2146</i>	5	2	0,778	0,623	-0,248
И-26	8	<i>Srac11.8</i>	2	5	0,000	0,245	1,000
		<i>Ptx2146</i>	4	6	0,625	0,602	-0,039
И-28	7	<i>Srac11.8</i>	5	5	0,500	0,609	0,179
		<i>Ptx2146</i>	4	3	0,714	0,704	-0,014
И-3	11	<i>Srac11.8</i>	3	7	0,571	0,439	-0,302
		<i>Ptx2146</i>	5	3	0,818	0,669	-0,222
И-7	7	<i>Srac11.8</i>	3	6	0,182	0,169	-0,073
		<i>Ptx2146</i>	3	3	0,429	0,602	0,288
		<i>Srac11.8</i>	2	4	0,333	0,444	0,250

И-8	<i>Pttx2146</i>	4	7	0,833	0,653	-0,277
	<i>Spac11.8</i>	7	4	0,889	0,796	-0,116
	<i>Pttx2146</i>	6	3	0,875	0,719	-0,217
	<i>Spac11.8</i>	2	5	0,556	0,475	-0,169
Среднее для потомства	<i>Pttx2146</i>	10	28	0,736	0,700	-0,050
	<i>Spac11.8</i>	11	16	0,459	0,812	0,435
Среднее для плюсовых деревьев	<i>Pttx2146</i>	7	11	0,800	0,661	-0,211
	<i>Spac11.8</i>	7	9	0,280	0,741	0,622

только 52 % семян происходили от скрещиваний между деревьями, произрастающими на плантации, а остальные семена образовались в результате заноса пыльцы извне [20].

В маркерной селекции сельскохозяйственных растений ищут и используют сочетание гомозигот в доминантном состоянии [17]. У плюсовых деревьев *P. sylvestris* самой встречаемой гомозиготой по локусу *Pttx2146* была 220/220 — 15,8 %. С частотой 17,2 % она обнаруживалась у их семенного потомства, однако только у 6 из 11 исследуемых деревьев. По локусу *Spac11.8* у плюсовых деревьев с частотой 32 % встречалась гомозигота 134/134 и лишь с частотой 18,8 % — у их потомства. Очевидно, что возможность применения этих гомозигот в селекционной практике *P. sylvestris* реально может быть оценена по результатам параллельного анализа сохранности у потомства способности к интенсивному росту.

Перекрестное опыление с привнесением пыльцы от разных растений архивно-клоновой плантации и, вероятно, извне приводит к формированию семенного потомства, заметно отличающегося по генетическим параметрам от материнских деревьев. При попарном сравнении генотипов плюсового дерева и его семенного потомства значения коэффициента подобия (J) Жаккара варьировали от 0,183 до 0,530. Средний уровень подобия между 26 плюсовыми деревьями был ниже, чем внутрисемейные различия потомства каждого из деревьев за исключением дерева № 8. Коэффициент J для совокупной выборки семенного потомства (95) составил 0,170, а для 26 деревьев — 0,230.

В случае исследований 27 плюсовых деревьев какао (*Theobroma cacao* L.) с использованием микросателлитных локусов значения J варьировали от 0,39 до 1,00 [19]. Существенная генетическая изменчивость и дифференциация выявлены в семенных плантациях сосны брутской (*Pinus brutia* Ten.) в Турции [15].

Кластеризация 11 исследуемых плюсовых деревьев *P. sylvestris* по гене-

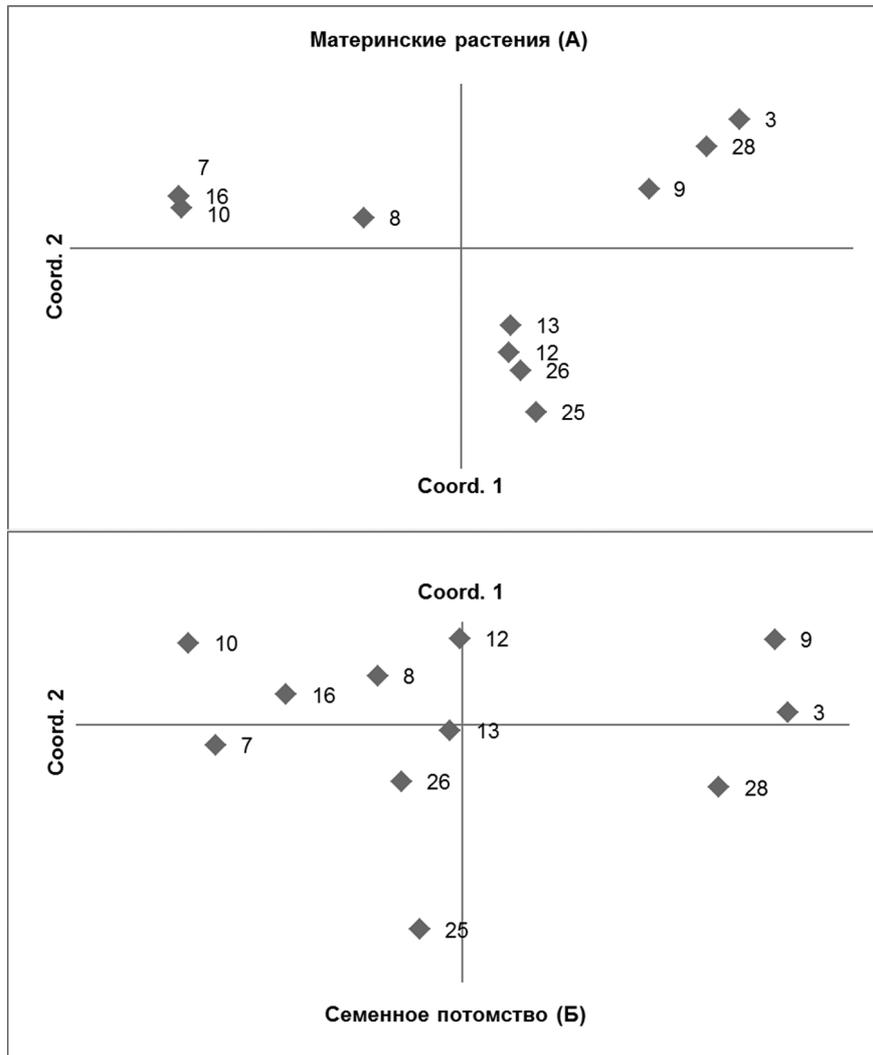


Рис. 3. Ординация плюсовых деревьев (А) и их семенного потомства (Б) методом главных компонент по генетическим дистанциям, полученным на основе частот аллелей двух микросателлитных локусов

тическим дистанциям (рис. 3, А) показала, что они разделяются на три группы: I — 7, 16, 10, 8; II — 13, 12, 26, 25; III — 9, 28, 3. Их семенное потомство (см. рис. 3, Б) кластеризуется более мозаично, хотя три группы в определенной степени сохраняются. Следовательно, семенное потомство 11 плюсовых деревьев *P. sylvestris* обладает несколько более высокой генетической изменчивостью, чем материнские растения. С этих позиций это потомство вполне применимо для лесоразведения, однако, судя по его генетическим отличиям от материнских растений, нет оснований для утверждения, что оно сохранит их селекционно важное качество — высокую интенсивность роста.

На примере плюсовых деревьев ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) с высокой и низкой гетерозиготностью показано, что у семенного потомства отдельных из них сохранялся близкий к материнским деревьям уровень гетерозиготности. У других деревьев внутрисемейный уровень гетерозиготности либо повышался, либо снижался. Повышен-

ный уровень гетерозиготности деревьев не приводил к однозначной передаче наследственных свойств их семенному потомству. Наиболее высокими адаптивными свойствами обладало потомство плюсовых деревьев с низким и средним уровнями гетерозиготности, а также отдельные высокогетерозиготные деревья [1]. Плюсовая селекция или массовый отбор на скорость роста приводит либо к возрастанию гетерозиготности, либо она остается на среднепопуляционном уровне [4]. Высокая индивидуальная гетерозиготность определяет высокие темпы развития и полового созревания живых организмов [3].

В селекции древесных растений важно минимизировать генетические потери популяционного разнообразия вида. С этой целью проводится сравнение генетической изменчивости выборок плюсовых деревьев и природных популяций. Например, параметры генетической изменчивости 29 популяций *P. abies* в Польше были высокими и превышали выборку плюсовых деревьев, а уровень генетической дифференциации в целом был низким ( $F_{ST} = 0,028$ ,  $D_N = 0,005$ ) и близким для плюсовых деревьев [16]. На основании оценки генетической изменчивости семенных плантаций анатолийской сосны черной (*Pinus nigra* Arnold subsp. *pallasiana*) методом RAPD показано, что использование клонов от 25–38 плюсовых деревьев при создании этих плантаций было адекватным, чтобы сохранить высокий уровень генетического разнообразия природных популяций данного вида [13].

Несмотря на неоднозначное отношение к плюсовой селекции, во многих странах продолжают активно разрабатывать ее методологические основы. Так, Ковалевич [7] рекомендовал из плюсовых деревьев, после определенных испытаний и оценки потомства, выделять элитные деревья, которые можно использовать для развития плантационного семеноведения. В принципе селекционный процесс у лесных древесных растений остается во многом эмпирическим, хотя в Белоруссии и России начали активно применять молекулярно-генетические маркеры [10, 11], не говоря о западных странах с развитым лесным хозяйством. В селекции сельскохозяйственных растений молекулярные маркеры используют уже давно, а в Южном биотехнологическом центре НААН Украины проведено ДНК-типирование на основе микросателлитных локусов сортов пшеницы, ячменя, кукурузы, сорго, сои и других культур [17]. Применять подобный анализ для плюсовых деревьев, в частности для *P. sylvestris*, значительно труднее. Для основной лесообразующей породы Украины не разработаны генетические карты, не найдены гены, однозначно контролируемые хозяйственно-ценные признаки. На первом этапе вполне можно использовать микросателлитные локусы *Pttx2146* и *Spac11.8* для идентификации региональных выборок плюсовых деревьев и оценки генетических параметров их семенного потомства. Поиск генов, осуществляющих контроль хозяйственно-важных признаков лесных древесных растений, активно проводимый учеными западных стран, приносит реальные результаты, однако лишь при достаточной изученности их геномов, а в Украине такие исследования практически не проводятся. Выборки плюсовых деревьев отличаются от сортов сельскохозяйственных растений тем, что это комбинации генотипов, и их в случае отбора в одном регионе в определенной степени можно рассматривать как сортопопуляцию.

Таким образом, 26 плюсовых деревьев *P. sylvestris* архивно-клоновой плантации обладают высоким уровнем генетической изменчивости,

определенной по микросателлитным локусам *Pttx2146* и *Spac11.8*. В следующем потомстве 11 плюсовых деревьев основные показатели генетического полиморфизма также были высокими, однако установлены существенные отличия между материнскими растениями и их потомками. Коэффициент подобия Жаккара варьировал от 0,183 до 0,530.

1. Авдеев Э.А., Голиков А.М. Влияние уровня гетерозиготности на репродуктивную и наследственную неравноценность плюсовых деревьев ели европейской // Материалы Междунар. науч. конф. «Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе». — Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2009. — С. 19–23.
2. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 3-е изд. — М.: Академкнига, 2003. — 431 с.
3. Алтухов Ю.П. Гетерозиготность генома, скорость полового созревания и продолжительность жизни // Докл. РАН. — 1996. — **348**, № 6. — С. 842–845.
4. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. и др. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. — 619 с.
5. Белобородов В.М., Ширяев В.И., Патлай И.Н. Интродуценты в культурах европейской части страны // Лесное хозяйство. — 1992. — № 8–9. — С. 38–39.
6. Видякин А.И. Проблемы и перспективы плюсовой селекции сосны и ели // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Современное состояние, проблемы и перспективы лесовосстановления и лесоразведения на генетико-селекционной основе». — Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2009. — С. 31–32.
7. Ковалевич А.И. Селекционное семеноводство в воспроизводстве лесов: состояние, проблемы и пути решения // Там же. — С. 13–18.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
9. Молотков П.И., Патлай И.Н., Давыдова Н.И. и др. Селекция лесных пород. — М.: Лесн. пром-сть, 1982. — 224 с.
10. Падутов В., Баранов О. ДНК-маркеры в лесах Беларуси // Лесная Россия. «Лесная генетика, селекция и биотехнологии в лесном хозяйстве». — 2008. — № 1. — С. 18–19.
11. Политов Д. Требуется изучение геномов лесных древесных растений // Там же. — С. 14–17.
12. Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // Biotechnol. Agr. Soc. Environ. — 2006. — **10**, N 2. — P. 77–81.
13. Cengel B., Tayanc Y., Kandemir G. et al. Magnitude and efficiency of genetic diversity captured from seed stands of *Pinus nigra* (Arnold) subsp. *pallasiana* in established seed orchards and plantations // New Forests. — 2012. — **43**, N 3. — P. 303–317.
14. Elsik C.G., Minihan V.T., Hall S.E. et al. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. // Genome. — 2000. — **43**. — P. 550–555.
15. Kandemir G., Kandemir I., Kaya Z. Genetic variation in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) seed stands as determined by RAPD markers // Silvae Genetica. — 2004. — **53**, N 4–5. — P. 169–175.
16. Lewandowski A., Burczyk J. Allozyme variation of *Picea abies* in Poland // Scandinavian J. Forest Res. — 2002. — **17**, N 6. — P. 487–494.
17. Sivolap Y.M. Molecular markers and plant breeding // Cytology and Genetics. — 2013. — **47**, N 3. — P. 188–195.
18. Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. // Mol. Ecol. — 1998. — **7**. — P. 1247–1263.
19. Thondaiman V., Rajamani K., Senthil N. et al. Genetic diversity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) plus trees in Tamil Nadu by simple sequence repeat (SSR) markers // Afr. J. Biotechnol. — 2013. — **12**, N 30. — P. 4747–4753.
20. Torimaru T., Wang X.-R., Fries A. et al. Evaluation of pollen contamination in an advanced scots pine seed orchard // Silvae Genetica. — 2009. — **58**, N 5–6. — P. 262–269.

Получено 28.03.2014

ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ПЛЮСОВИХ ДЕРЕВ *PINUS SYLVESTRIS* L. ТА ЇХ НАСІННЕВОГО ПОТОМСТВА ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ЛОКУСАМИ

А.Є. Демкович<sup>1</sup>, І.І. Коршиков<sup>1</sup>, Д.В. Політов<sup>2</sup>, О.А. Мудрик<sup>2</sup>, С.А. Лось<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Донецький ботанічний сад Національної академії наук України

<sup>2</sup>Федеральна державна бюджетна установа науки «Інститут загальної генетики ім. М.І. Вавилова Російської академії наук», Москва

<sup>3</sup>Український орден «Знак Пошани» науково-дослідний інститут лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького, Харків

Вивчено генетичний поліморфізм 26 плюсових дерев *Pinus sylvestris* L. української селекції за мікросателітними локусами *Pttx2146* і *Spac11.8*, а також насінневого потомства 11 дерев. У загальній вибірці дерев виявлено по 7 алелів кожного локусу, тоді як у насінневого потомства їх було 10 та 11. Середня наявна гетерозиготність ( $H_o$ ) за локусом *Pttx2146* у плюсових дерев була 0,800, у потомства — 0,736, за локусом *Spac11.8* — помітно нижчою (відповідно 0,280 і 0,495). За цим локусом плюсовим породам властива нестача гетерозигот 43,5, потомству — 62,2 %, за локусом *Pttx2146* — надлишок 21,0 і 5,0 %. Генетичний коефіцієнт подібності Жаккара кожного плюсового дерева та його насінневого потомства варіював від 0,183 до 0,530 і для сукупної вибірки 95 потомків становив 0,170, для 26 дерев — 0,203.

GENETIC POLYMORPHISM OF *PINUS SYLVESTRIS* L. PLUS TREES AND THEIR PROGENIES BY SSR LOCI

A.Ye. Demkovych<sup>1</sup>, I.I. Korshikov<sup>1</sup>, D.V. Politov<sup>2</sup>, E.A. Mudrik<sup>2</sup>, S.A. Los<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine  
110 Illicha Avenue, Donetsk, 83059, Ukraine

<sup>2</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences  
3 Gubkina St., Moscow, 119333, Russia

<sup>3</sup>G.N. Vysotsky Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration  
86 Pushkinska St., Kharkiv, 61024, Ukraine

Microsatellite loci *Pttx2146* and *Spac11.8* were used to study genetic polymorphism in 26 plus trees clones of *Pinus sylvestris* L. selected in Ukraine and their eleven progenies. There were revealed seven alleles of each locus in the total tree sample, and 10 or 11 in their progenies. The estimated genic diversity ( $H_o$ ) at *Pttx2146* locus was found to be 0.800 in plus trees and 0.736 in progenies, at *Spac11.8* was significantly lower (0.280 and 0.495 respectively). A lack of heterozygotes at this locus was 43,5 % in plus trees and 62.2 % in progeny, whereas an excess of heterozygosity was 21.0 % and 5 % respectively at *Pttx2146* locus. Jaccard's similarity coefficient (J) of each plus tree and its progenies ranged from 0.183 to 0.530 making 0.170 for the total tree sample of 95 progenies, and 0.203 for 26 trees.

**Key words:** *Pinus sylvestris* L., SSR, genetic variation, plus trees, seed progeny.