

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЛОЗИМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА МАТЕРИНСКИХ ДЕРЕВЬЕВ И ИХ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА У ПИХТЫ БЕЛОЙ (*ABIES ALBA* MILL.) ИЗ ПОПУЛЯЦИИ УКРАИНСКИХ КАРПАТ

Изучена изменчивость изоферментов двух ферментных систем, кодируемых пятью локусами, у взрослых растений, зародышей семян и в пуле отцовских гамет природной популяции *Abies alba* Mill. в Украинских Карпатах. Существенная аллельная и генотипическая гетерогенность между материнскими деревьями и зародышами семян обнаружена для трех из пяти анализируемых локусов. Доля полиморфных локусов по 95%- и 99%-му критериям и среднее число аллелей на локус у материнских растений оказались соответственно на 25%, 20% и 16,7% больше, чем у зародышей семян. В выборке материнских деревьев отмечен 6,7%-й избыток гетерозигот, а в выборке зародышей семян – 17,6%-й их недостаток, что может быть результатом избыточного самоопыления семян.

*Abies alba* Mill. – ценная порода Украинских Карпат, интенсивно используемая на протяжении многих столетий в хозяйственных целях. Активному природному возобновлению и искусственному ее разведению препятствуют низкая естественная всхожесть семян и медленный рост сеянцев. Вследствие этого площади *A. alba* в Украинских Карпатах за последние 200 лет сократились более чем на 30%, уступив место искусственно созданным ельникам и низкопродуктивным древостоям граба, березы, осины и других пород [3, 9, 13]. В отдельных районах отмечено сокращение площадей *A. alba* из-за избыточной преждевременной гибели растений в естественных древостоях. Причиной этого может быть конкуренция со стороны ели и бука и снижение генетического разнообразия *A. alba* в ряду поколений [10, 13, 18]. Поэтому изучение динамики генетической изменчивости в демографических элементах популяций *A. alba* в Украинских Карпатах является актуальной задачей. Эти знания необходимы для решения вопросов воспроизводства уровня генетической изменчивости популяций вида при его искусственном лесо-

разведении в пределах естественного ареала и особенно при интродукции.

Цель данной работы – анализ воспроизводства уровня аллозимного полиморфизма взрослых растений популяции *A. alba* в Украинских Карпатах в их семенном потомстве.

Объектом исследования послужили деревья *A. alba* возрастом 110–150 лет, произрастающие на высоте 600–650 м над уровнем моря на территории Старосамборского лесничества в Украинских Карпатах. Сборы семян в этой популяции были проведены самостоятельно с 29 деревьев. Для анализа генетической изменчивости материнских деревьев использовали гаплоидные эндоспермы семян, а потомства – диплоидные зародыши. В качестве генетических маркеров применяли изоферменты двух ферментных систем: глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К.Ф. 2.6.1.1) и алкогольдегидрогеназы (ADH, К.Ф. 1.1.1.1). Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из эндосперма и зародыша одного семени, проводили параллельно в вертикальных пластинках 7,5%-го полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8,9 [7]. У каждого дерева таким способом анализировали не менее четырех семян. Гистохимическое окрашивание изофер-

ментов на гелевых пластинках осуществляли по общепринятым методикам с незначительными модификациями [2], а для обозначения локусов и аллелей использовали систему С. Пракаша [16]. Расчет основных показателей генетического полиморфизма осуществляли, используя программу BIOSYS-1 [18].

Электрофоретический анализ изоферментов гаплоидных эндоспермов семян конкретного растения позволяет определить его генотип. При параллельном разделении изоферментов эндосперма и зародыша можно вычленить гаплотип пыльцы или идентифицировать отцовские аллели в зародыше [1]. В ходе проведенных исследований было установлено, что синтез глутаматоксалоацетаттрансаминазы у *A. alba* контролируется тремя локусами (Got-1, Got-2, Got-3), а алкогольдегидрогеназы – двумя локусами (Adh-1, Adh-2). Для этих пяти локусов было выявлено 12 электрофоретических аллельных вариантов (табл. 1). Частоты аллелей в выборке зародышей семян ( $N = 120$ ) и пуле отцовских гамет оказались достаточно близкими, и ни по одному из 5 локусов не выявлено достоверных отличий с помощью  $\chi^2$  – теста. При попарном сравнении аллельных структур материнских деревьев и зародышей семян была отмечена достоверная аллельная гетерогенность по трем локусам: Got-2, Adh-2 и Adh-1. Два редких аллеля – Got-2<sup>0,97</sup>, Got-2<sup>0,93</sup>, выявленные у гетерозиготных по ним материнских растений, отсутствовали как в отцовских гаметах, так и в зародышах семян. Причина этого – элиминация редких аллелей на прогамном и сингамном этапах половой репродукции. В выборке взрослых деревьев в четырех из пяти локусов отмечен 3–32%-й избыток гетерозигот. У зародышей семян 9,5%-й эксцесс гетерозигот выявлен только по одному локусу – Adh-1. Все 120 зародышей по локусу Got-2 были мономорфными, а наибольший дефицит гетерозигот был свойственен локусу Got-3 (33,1%). Все это свидетельству-

ет, о том, что в изучаемой популяции *A. alba* большая доля семян образуется в результате самоопыления семян. В целом этот эффект достаточно характерен для многих видов хвойных [4].

Таблица 1. Состав и частоты аллелей, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности для материнских растений, зародышей семян и пула отцовских гамет в популяции *Abies alba* в Украинских Карпатах

| Локус | Аллель, наблюдаемая (Ho) и ожидаемая (He) гетерозиготности | Частота аллелей               |                          |                     | $\chi^2$ – тест для деревьев и зародышей |
|-------|--|-------------------------------|--------------------------|---------------------|--|
|       |  | Материнские растения (N = 29) | Зародыши семян (N = 120) | Пул отцовских гамет |  |
| Got-1 | 1,00   | 0,983                         | 0,987                    | 0,992               | 0,05 (1)                                 |
|       | 1,08   | 0,017                         | 0,013                    | 0,008               |  |
|       | Ho   | 0,034                         | 0,025                    | –                   |  |
|       | He   | 0,033                         | 0,026                    | –                   |  |
| Got-2 | 1,00   | 0,948                         | 1,00                     | 1,00                | 12,60 (2)**                              |
|       | 0,97   | 0,035                         | –                        | –                   |  |
|       | 0,93   | 0,017                         | –                        | –                   |  |
|       | Ho   | 0,103                         | 0,00                     | –                   |  |
| Got-3 | He   | 0,100                         | 0,00                     | –                   |  |
|       | 1,27   | 0,241                         | 0,183                    | 0,175               | 1,004 (1)                                |
|       | 1,00   | 0,759                         | 0,817                    | 0,825               |  |
|       | Ho   | 0,483                         | 0,200                    | –                   |  |
| He    | 0,366  | 0,299                         | –                        |                     |  |
| Adh-1 | 1,04   | 0,397                         | 0,263                    | 0,350               | 4,08 (1)*                                |
|       | 1,00   | 0,603                         | 0,737                    | 0,650               |  |
|       | Ho   | 0,586                         | 0,425                    | –                   |  |
|       | He   | 0,479                         | 0,388                    | –                   |  |
| Adh-2 | 1,04   | 0,138                         | 0,054                    | 0,033               | 11,40 (2)**                              |
|       | 1,00   | 0,534                         | 0,750                    | 0,717               |  |
|       | 0,78   | 0,328                         | 0,196                    | 0,250               |  |
|       | Ho   | 0,448                         | 0,267                    | –                   |  |
|       | He   | 0,588                         | 0,396                    | –                   |  |

Примечание. Различия по критерию  $\chi^2$  достоверны: \* – при  $P < 0,05$ ; \*\* – при  $P < 0,01$ ; в скобках указано число степеней свободы.

В исследуемой популяции *A. alba* описано 15 генотипов пяти анализируемых локусов как у материнских деревьев, так и у зародышей семян. Однако у трех из пяти локусов обнаружены существенные различия в генотипической структуре материнских деревьев и их семенного потомства. В целом

Таблица 2. Частоты генотипов для материнских растений и зародышей семян в популяции *Abies alba* в Украинских Карпатах

| Локус | Генотип   | Частота генотипов    |                | $\chi^2$ - тест |
|-------|-----------|----------------------|----------------|-----------------|
|       |           | Материнские растения | Зародыши семян |                 |
| Got-1 | 1,00/1,00 | 0,966                | 0,975          | 0,07 (1)        |
|       | 1,08/1,00 | 0,034                | 0,025          |                 |
| Got-2 | 1,00/1,00 | 0,897                | 1,00           | 14,64 (2)***    |
|       | 1,00/0,97 | 0,069                | 0,00           |                 |
|       | 1,00/0,93 | 0,034                | 0,00           |                 |
| Got-3 | 1,00/1,00 | 0,517                | 0,717          | 11,12 (2)**     |
|       | 1,27/1,00 | 0,483                | 0,200          |                 |
|       | 1,27/1,27 | 0,00                 | 0,083          |                 |
| Adh-1 | 1,00/1,00 | 0,310                | 0,525          | 4,69 (2)        |
|       | 1,04/1,04 | 0,104                | 0,050          |                 |
|       | 1,04/1,00 | 0,586                | 0,425          |                 |
| Adh-2 | 1,00/1,00 | 0,310                | 0,625          | 12,45 (5)*      |
|       | 1,04/1,00 | 0,138                | 0,042          |                 |
|       | 1,04/1,04 | 0,069                | 0,025          |                 |
|       | 1,00/0,78 | 0,310                | 0,208          |                 |
|       | 1,04/0,78 | 0,00                 | 0,017          |                 |
|       | 0,78/0,78 | 0,173                | 0,083          |                 |

Примечание. Различия по критерию  $\chi^2$  достоверны: \* – при  $P < 0,05$ ; \*\* – при  $P < 0,01$ ; \*\*\* – при  $P < 0,001$ ; в скобках указано число степеней свободы.

можно отметить, что по сравнению с генотипическим составом материнских растений у зародышей наблюдается тенденция к увеличению частот встречаемости гомозиготных генотипов. Наиболее существенно возрастает доля гомозигот в зародышах, составляющая в локусах Got-3 – 134%, Adh-1 – 169% и Adh-2 – 202% по отношению к материнским растениям. Это объясняется избыточным уровнем самоопыления семян растений в изучаемой популяции *A. alba* (табл. 2).

Для оценки генетического разнообразия у взрослых растений и зародышей семян определяли значения основных параметров генетической изменчивости (табл. 3). Уровень аллозимной изменчивости как у взрослых растений, так и у зародышей *A. alba*, по изученным генным локусам оказался довольно высоким.

При этом у взрослых растений доля полиморфных локусов по 95%- и 99%-му критериям и среднее число аллелей на локус (A) были на 25%, 20% и 16,7% выше, чем соответствующие показатели у зародышей семян. У взрослых особей уровень наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) превышал теоретически ожидаемую ( $H_e$ ) на 6,7%, а у зародышей наблюдалась обратная картина – значительный недостаток гетерозигот (17,6%). В целом значения средней наблюдаемой и средней ожидаемой гетерозиготности у взрослых деревьев превышали соответствующие показатели у зародышей на 44,7% и

Таблица 3. Значения основных параметров генетической изменчивости материнских растений и зародышей семян в популяции *Abies alba* в Украинских Карпатах

| Анализируемая выборка | Доля полиморфных локусов |          | Среднее число на локус |                  | Средняя гетерозиготность |                    | Индекс фиксации Райта, F |
|-----------------------|--------------------------|----------|------------------------|------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
|                       | $P_{95}$                 | $P_{99}$ | аллелей, A             | генотипов, $P_g$ | ожидаемая, $H_e$         | наблюдаемая, $H_o$ |                          |
| Материнские растения  | 0,80                     | 1,00     | 2,40                   | 3,00             | $0,313 \pm 0,034$        | $0,331 \pm 0,035$  | -0,067                   |
| Зародыши семян        | 0,60                     | 0,80     | 2,00                   | 3,00             | $0,222 \pm 0,015$        | $0,183 \pm 0,014$  | 0,176                    |

29,1%. Дефицит гетерозигот в выборках зародышей и их избыток у взрослых растений отмечен и для других видов хвойных [4, 8, 14, 17]. Согласно литературным данным [5, 8], отмеченный феномен недостатка гетерозигот на ранних этапах онтогенеза (зародыши, подрост) и их эксцесс на более поздних этапах может быть объяснен инбридингом при самоопылении растений и последующим отбором в пользу гетерозиготных генотипов. Генетическая дистанция М. Нея [15] между зародышами семян и материнскими растениями *A. alba* оказалась довольно высокой, составив 0,014, что также свидетельствует о различиях в их генетических структурах.

Таким образом, при сравнении зародышей семян и материнских растений *A. alba* выявлен заметный дефицит гетерозиготных генотипов у семенного потомства карпатской популяции. Объяснить столь значительный дефицит гетерозигот в целом у *A. alba* в пределах ее ареала в Украине можно лишь изучив большее число популяций и проанализировав большое количество аллозимных локусов. Инбредная депрессия семенного потомства может стать одной из причин снижения адаптационного потенциала этого вида и, как следствие, низкой продуктивности и даже преждевременной гибели искусственных пихтовых лесов и интродукционных насаждений.

1. Алтухов Ю.П., Гафаров Н.Н., Крутовский К.В., Духарев В.А. Аллозимный полиморфизм в природной популяции ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.). Сообщение III. Корреляция между уровнем индивидуальной гетерозиготности и относительным количеством нежизнеспособных семян // Генетика. – 1986. – 22, № 12. – С. 2825–2830.

2. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др. – М.: Наука, 1977. – 275 с.

3. Голубец М.А. Ельники Украинских Карпат. – К.: Наук. думка, 1978. – 264 с.

4. Коршиков И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – К.: Наук. думка, 1996. – 238 с.

5. Крутовский К.В., Политов Д.В., Алтухов Ю.П. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сос-

ны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение II. Уровни аллозимной изменчивости в природной популяции Западного Саяна // Генетика. – 1988. – 24, № 1. – С. 118–125.

6. Милкина Л.И. Об экологии и распространении пихтовых лесов в Украинских Карпатах в связи с задачей их картирования и восстановления // Ботан. журн. – 1983. – 68, № 4. – С. 503–513.

7. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в ПААГ // Биохим. методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1977. – С. 113–136.

8. Старова Н.В., Янбаев Ю.А., Юмадилов Н.Х., и др. Генетическая изменчивость сосны обыкновенной в возрастных группах // Генетика. – 1990. – 26, № 3. – С. 498–505.

9. Тереля И.П. Современная структура пихтовых лесов Карпат // География и природные ресурсы. – 1989. – № 4. – С. 140–142.

10. Швиденко А.И. Ареал пихты и плотность ее популяций на Советской Буковине // Лесоведение. – 1986. – № 4. – С. 63–69.

11. Bo L. Die weibtanne – line sterbende Baumas? Das weibtan Tannensterben im Lichte neuerer Erkenntnisse // Allg. Forstztg. – 1986. – 97, No 3. – S. 59.

12. Hartig M. Zur Bedeutung der Weibtanne (*Abies alba* Mill.) in den sächsisch – thüringischen Mittelgebirgen // Naturschutzarb. Sachsen. – 1986. – 28. – P. 33–42.

13. Moller K. Genetische Untersuchungen bei der Tanne mit Hilfe von Enzym-Genmarkern. Geographische Variation an drei Enzym-Genloci // Allg. Forstztg. – 1986. – 97, No 3. – S. 60–61.

14. Muona O., Yazdani R., Rudin D. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris*: allozyme variation in seeds and planted seedlings // *Silvae Genet.* – 1987. – 36. – P. 30–42.

15. Nei M. Genetic distance between populations // *Amer. Naturalist.* – 1972. – 106. – P. 283–292.

16. 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.

17. Shaw D.V., Allard R.W. Isozyme heterozygosity in adult and open pollinated embryo samples of Douglas fir // *Silva Fennica.* – 1982. – 16. – P. 115–121.

18. 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, No 4. – P. 281–283.

Рекомендовал к печати П.А. Мороз

Н.М. Морозова, І.І. Коршиков

Донецький ботанічний сад НАН України,  
Україна, м. Донецьк

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АЛОЗИМНОГО  
ПОЛІМОРФІЗМУ МАТЕРИНСЬКИХ ДЕРЕВ ТА  
ЇХ НАСІННЕВОГО ПОТОМСТВА В ЯЛИЦІ  
БІЛОЇ (*ABIES ALBA* MILL.) З ПОПУЛЯЦІЇ  
УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ

Вивчена мінливість ізоферментів двох ферментних систем, що кодуються п'ятьма локусами, у дорослих рослин, зародків насіння та у пулі батьківських гамет природної популяції *Abies alba* Mill. в Українських Карпатах. Істотну аельну й генотипову гетерогенність між материнськими деревами і зародками насіння відмічено для трьох з п'яти локусів, що аналізуються. Частка поліморфних локусів за 95%-та 99%-м критеріями і середнє число алелів на локус у материнських рослин виявилась відповідно на 25%, 20% та 16,7% більше, ніж у зародків насіння. У вибірці материнських дерев зафіксовано 6,7%-й надлишок гетерозигот, а у вибірці зародків насіння – 17,6%-ва їх нестача, що може бути результатом надмірного самозапилення насінневих зачатків.

N.N. Morozova, I.I. Korshikov

The Donetsk Botanical Gardens, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Donetsk

COMPARATIVE ANALYSIS OF ALLOZYME  
POLYMORPHISM OF *ABIES ALBA* MILL.  
MATERNAL TREES AND THEIR PROGENY  
IN THE UKRAINIAN CARPATHIANS

Variation of isoenzymes in two enzyme systems encoded by five loci was studied in maternal plants, seed embryos and pool of paternal gametes of the *Abies alba* Mill. population in the Ukrainian Carpathians. Comparing the maternal trees and seed embryos, we found essential allele and genotypic heterogeneity for 3 from 5 analyzed loci. The percentage of polymorphic loci by 95 and 99% criteria and average number of alleles per locus in maternal trees were 25%, 20% and 16,7% higher than in seed embryos. A 6,7% surplus of heterozygotes was found in the samples of maternal trees, and a 17,6% deficiency of them in the embryos samples, that may be due to excessive self-pollination of seed-buds.