

И. И. Коршиков, А. Н. Лисничук, Т. И. Великоридько,
Л. А. Калафат

Генетическая изменчивость сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в реликтовых популяциях Кременецкого холмогорья и Малого Полесья

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Т. М. Черевченко)

*Genetic variation of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) for 19 allozyme loci has been studied in three relict populations of Kremenets'koe Kholmogor'e and Maloe Poles'e. The percentage of polymorphic loci in these populations was 78.9%, and the observed and expected heterozygosities were $H_O = 0.197$ and $H_E = 0.205$, respectively. Populations are characterized by a low subdivision ($F_{ST} = 0.008$) and differentiation ($D_N = 0.083$).*

Реликтовые популяции растений особо интересны для исследований генетической структуры, так как в них представлены эволюционно ранние гены, с которыми виды выживали еще в ледниковый период. Остатки реликтовых популяций главной лесообразующей породы Украины — сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) сохранились в Карпатах, Малом Полесье и Кременецком холмогорье. Карпатские популяции, как показал сравнительный анализ популяционно-генетической изменчивости *P. sylvestris* в разных растительных зонах, характеризовались наименьшим аллельным разнообразием и уровнем гетерозиготности [1]. Возможно, эта их особенность связана не только с доледниковым происхождением, но и с местом произрастания, так как сравнивались карпатские горные с равнинными популяциями степной, лесостепной зон и Полесья. В проведенном исследовании отсутствовали уникальные реликтовые популяции Вольно-Подольской возвышенности.

Наша цель — анализ генетической структуры, подразделенности и дифференциации реликтовых популяций *Pinus sylvestris* Кременецкого холмогорья и Малого Полесья.

Для определения генотипа растения в качестве биохимических маркеров использовали изоферменты девяти ферментных систем: алкогольдегидрогеназы (АДН, К. Ф. 1.1.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаминазы (ГОТ, К. Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназы (ГДН, К. Ф. 1.4.1.2), диафоразы (DIA, К. Ф. 1.6.4.3), кислой фосфатазы (АСР, К. Ф. 3.1.3.2), лейцин-аминопептидазы (ЛАР, К. Ф. 3.4.11.1), малатдегидрогеназы (МДН, К. Ф. 1.1.1.37), супероксиддисмутазы (СОД, К. Ф. 1.15.1.1) и формиатдегидрогеназы (ФДН, К. Ф. 1.2.1.2).

Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из восьми и более эндоспермов семян каждого растения, проводили в вертикальных пластинках 7,5%-го полиакриламидного геля с рН 8,9 разделяющего геля в трис-глициновом электродном буфере, рН 8,3 [2]. Для оценки уровня изменчивости определяли частоты аллелей изучаемых локусов в популяциях трех таксонов. Подразделенность популяций выясняли, используя показатели *F*-статистик Райта и *G*-статистики Нея, а дифференциацию устанавливали с помощью генетической дистанции Нея [3]. Обозначали аллели по системе С. Пракаша [4]. Аллельную гетерогенность популяций оценивали по стандартному χ^2 -тесту [5]. В статистической обработке генетических данных использовали пакет компьютерных программ BIOSYS-1 [6].

Таблица 1. Число аллелей и генотипов, их гетерогенность, средние полокусные значения гетерозиготности для трех реликтовых популяций *Pinus sylvestris* L. Кременецкого холмогорья и Малого Полесья

Фермент	Локус	Количество в общей выборке		χ^2 -тест на гетерогенность		Гетерозиготность	
		аллелей	генотипов	аллелей	генотипов	наблюдаемая	ожидаемая
Алкогольдегидрогеназа	Adh-1	3	3	4,69(4)	6,60(6)	0,098	0,161
	Adh-2	3	4	8,52(4)	7,56(6)	0,123	0,168
Глутаматдегидрогеназа	Gdh	2	3	0,71(2)	6,16(4)	0,533	0,472
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза	Got-1	2	2	0,04(2)	0,04(2)	0,032	0,032
	Got-2	2	3	1,08(2)	8,61(4)	0,429	0,441
	Got-3	3	4	8,13(4)	8,59(6)	0,415	0,453
Диафораза	Dia-1	4	6	12,59(6)	11,52(12)	0,403	0,470
	Dia-2	3	4	6,07(4)	13,76(6)*	0,039	0,038
	Dia-4	3	4	14,45(4)***	20,21(4)***	0,078	0,084
Кислая фосфатаза	Acp	5	7	6,92(8)	9,69(12)	0,389	0,362
Лейцинаминопептидаза	Lap-1	4	6	5,14(6)	7,80(10)	0,221	0,234
	Lap-2	5	6	7,75(8)	9,68(12)	0,254	0,236
Малатдегидрогеназа	Mdh-2	2	2	0,09(2)	0,09(2)	0,059	0,056
	Mdh-3	2	3	1,20(2)	3,53(4)	0,441	0,401
Формиатдегидрогеназа	Fdh	2	3	0,37(2)	1,29(4)	0,227	0,249
Супероксиддисмутаза	Sod-1	1	1	0	0	0	0
	Sod-2	1	1	0	0	0	0
	Sod-3	1	1	0	0	0	0
	Sod-4	2	2	4,26(2)	8,55(2)*	0,006	0,006

Примечание. В скобках указаны степени свободы. Достоверные отличия при: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

У 154 деревьев трех реликтовых популяций *P. sylvestris* Кременецкого холмогорья и Малого Полесья выявлено 50 аллелей 19 исследуемых аллозимных локусов, из которых 16 были полиморфными (табл. 1). Наиболее высокая изменчивость была свойственна шести локусам — Gdh, Got-2, Got-3, Mdh-3, Dia-1, Asp, средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_O) которых составляла 38,9–53,3%. Средним уровнем изменчивости в популяциях характеризовались три локуса — Lar-1, Lar-2, Fdh, значение H_O для них варьировало в пределах 22,1–25,4%. Низкоизменчивыми локусами были Sod-4 ($H_O = 0,6\%$), Got-1 ($H_O = 3,2\%$) и Dia-2 ($H_O = 3,9\%$). Количество аллелей в трех популяциях составляло около 39–43 на 19 локусов. При этом в Суражской даче, где объем исследуемой выборки растений был в 2,34 раза меньше, чем в урочище Бир, различия в аллельном представительстве касалось только одного аллеля. Частоты наиболее встречаемого преобладающего аллеля (1,00) в популяциях у всех 16 полиморфных локусов были выше 0,5.

В объединенной выборке трех популяций *P. sylvestris* по анализируемым 19 локусам выявлено 65 генотипов, а в каждой популяции их было 48–56 или 73,8–86,2% общего количества. В двух популяциях — Суражская дача и Заречье фактическое распределение генотипов соответствовало теоретически ожидаемому согласно закону Харди — Вайнберга. В популяции урочища Бир обнаружены три локуса — Gdh, Dia-1, Adh-1, по которым распределение генотипов существенно отклонялось от равновесия.

Значимая аллельная гетерогенность при сравнении трех популяций обнаружена только по одному локусу Dia-4, генотипическая — по трем слабополиморфным локусам Dia-2, Dia-4, Sod-4. Такой уровень расхождений в количестве и частотах аллелей и генотипов считается низким для природных популяций *P. sylvestris* [1].

Наиболее высокая доля полиморфных локусов 84,2% установлена в популяции Суражская дача, в остальных двух она составляла 73,7% (табл. 2). Значение наблюдаемой гетерозиготности в популяции Заречье было на 10% ниже, чем в двух других популяциях. Средний уровень ожидаемой гетерозиготности в изучаемых популяциях был очень близок $H_E = 0,201 \div 0,205$. В популяциях Суражская дача и урочище Бир значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности совпадают, что свидетельствует об равновесности их генетической структуры. По среднему уровню гетерозиготности реликтовые популяции *P. sylvestris* Кременецкого холмогорья и Малого Полесья близки к реликтовым карпатским популяциям ($H_O = 0,185 \div 0,194$; $H_E = 0,193 \div 0,197$), однако заметно уступают степным популяциям ($H_O = 0,239 \div 0,272$; $H_E = 0,230 \div 0,259$) и лесостепным популяциям ($H_O = 0,229 \div 0,300$; $H_E = 0,228 \div 0,261$), изменчивость которых изучалась по этим же локусам [1].

Согласно средним значениям внутривидового коэффициента инбридинга (F_{IS}) в реликтовых популяциях имеет место 3,3%-й недостаток гетерозигот (табл. 3). Популяции

Таблица 2. Значения основных показателей генетического полиморфизма в реликтовых популяциях *Pinus sylvestris* Кременецкого холмогорья и Малого Полесья

Место произрастания популяций	Доля полиморфных локусов, P_{99}	Среднее количество на локус		Средняя гетерозиготность		Индекс фиксации Райта (F)
		аллелей	генотипов	ожидаемая (H_E)	наблюдаемая (H_O)	
Суражская дача	0,842	2,211	2,526	$0,204 \pm 0,015$	$0,205 \pm 0,015$	-0,004
Урочище Бир	0,737	2,263	2,947	$0,205 \pm 0,010$	$0,205 \pm 0,010$	0
Заречье	0,737	2,105	2,737	$0,201 \pm 0,011$	$0,184 \pm 0,011$	0,085
Среднее	0,789	2,579	3,473	$0,205 \pm 0,007$	$0,197 \pm 0,007$	0,039

крайне слабо подразделены и слабо дифференцированы, о чем свидетельствуют очень низкие средние значения коэффициентов F_{ST} и G_{ST} . Генетическая дистанция Нея (D_N) между популяциями варьировала в пределах 0,001–0,005, составив в среднем 0,003. Это в шесть раз меньше, чем генетическая дистанция между горными карпатскими и равнинными степными и лесостепными популяциями в пределах ареала *P. sylvestris* в Украине [1].

Таким образом, проведенный сравнительный анализ показывает, что реликтовые популяции *P. sylvestris* Кременецкого холмогорья и Малого Полесья отличаются меньшим уровнем изменчивости, чем постледниковые популяции этого вида в других частях равнинного ареала. Очевидно, такую особенность постледниковых популяций можно объяснить диффузностью их ареала из-за наступления и отступления ледника. Это приводило к усилению интенсивности миграции, изменению потока генов, повышению частоты их комбинаций. С другой стороны, более низкий средний уровень гетерозиготности растений реликтовых популяций, вероятно, может быть связан с меньшим представительством в их геномах летальных и сублетальных генов. Из-за слабого притока генов извне, большинство скрещиваний в изолированных небольших реликтовых популяциях, длительно в ходе смен поколений, происходило внутри них. Естественный отбор способствовал повышению частот комбинаций генов, обеспечивающих лучшую приспособленность популяций к занимаемой территории. Такие комбинации генов могут определяться большей степенью неслучайности кроссинговера у растений реликтовых популяций, по сравнению с несколько генетически модифицированными, за счет более интенсивного обмена генами, растениями постледниковых популяций.

Очевидно, что реликтовые популяции *P. sylvestris* Кременецкого холмогорья и Малого Полесья характеризуются определенной уникальностью генетической структуры и могут быть донорами генов устойчивости, которые прошли длительный эволюционный отбор. Генетическая структура этих популяций может служить эталоном для создаваемых в этом

Таблица 3. Значение коэффициента F -статистики Райта и G -статистики Нея для реликтовых популяций *Pinus sylvestris* L. Кременецкого холмогорья и Малого Полесья

Локус	F_{IS}	F_{ST}	G_{ST}
Gdh	-0,130	0,002	0,002
Got-1	-0,001	0,000	0,000
Got-2	0,036	0,004	0,004
Got-3	0,090	0,013	0,013
Mdh-2	-0,044	0	0
Mdh-3	-0,096	0,004	0,004
Dia-1	0,148	0,014	0,014
Dia-2	-0,011	0,011	0,011
Dia-4	0,064	0,048	0,044
Sod-1	0	0,000	0,000
Sod-2	0	0,000	0,000
Sod-3	0	0,000	0,000
Sod-4	-0,006	0,014	0,014
Asp	-0,070	0,005	0,003
Adh-1	0,378	0,005	0,001
Adh-2	0,217	0,012	0,016
Lap-1	0,046	0,005	0,003
Lap-2	-0,077	0,007	0,010
Fdh	0,080	0,001	0,001
Среднее	0,033	0,008	0,007

районе искусственных лесонасаждений. Унікальність генофонда кожної реликтовий популяції потребує підвищення їх охораняемого статусу з можливим створенням національного парку в Кременецькому холмогор'є і Малому Поліс'є.

1. Коршиков И. И., Калафат Л. А., Пирко Я. В., Великоридько Т. И. Популяционно-генетическая изменчивость сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в основных лесорастительных районах Украины // Генетика. – 2005. – **41**, № 2. – С. 216–228.
2. Davis B. J. Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – **121**. – P. 404–427.
3. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. – 1972. – **106**. – P. 283–292.
4. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby T. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 4. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics (US). – 1969. – **61**. – P. 841–858.
5. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. – Москва: Наука, 1991. – 271 с.
6. 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.

Донецький ботаничний сад НАН України

Поступило в редакцію 18.04.2008

УДК 612.017.1.579.861.2

© 2008

В. В. Позур, Л. М. Сківка, Г. П. Потєбня

Вплив аутовакцини на основі пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на динаміку росту експериментальних пухлин у мишей

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

The effect of peptidoglycan from Staphylococcus aureus Wood 46 and cancer autovaccine supplemented with PG on the growth of experimental tumors in mice is investigated. It is shown that bacterial peptidoglycan both alone and as a part of the cancer autovaccine inhibits the growth of tumors. The cancer autovaccine with PG had the most suppressive effect on the Lewis lung carcinoma growth: tumor sizes in experimental animals were by 37% smaller than those in control.

Використання аутовакцин посідає одне з провідних місць в структурі імунотерапевтичних методів лікування онкологічних патологій [1, 2]. Цей методичний підхід спрямований на активацію специфічного протипухлинного імунітету і забезпечує профілактику метастазів і рецидивів злякисного новоутворення [3]. З метою підвищення імуногенності вакцинних препаратів в онкології як ад'юванти найчастіше використовують ліганди toll-like рецепторів, які здебільшого являють собою компоненти бактеріальних клітин. Це так звані патогенасоційовані мікробні структури (РАMS) [4]. Вакцини на основі аутологічних пухлинних клітин та лектину *B. subtilis* АВ-56 вже багато років успішно застосовуються в імунотерапії онкохворих для профілактики рецидивів та метастазів злякисних пухлин [5].

Пептидоглікан (муреїн, глікопротеїд) (ПГ) — головний універсальний і невід'ємний компонент клітинної стінки фактично всіх бактерій [6]. ПГ різних видів бактерій неоднакові