

С.Н. Привалихин¹, Е.А. Мудрик², И.В. Макогон¹, И.И. Коршиков¹, Д.В. Политов²

ДОЛЯ ПЕРЕКРЕСТНОГО ОПЫЛЕНИЯ И УРОВНИ ИНБРИДИНГА *PICEA ABIES* (L.) KARST. В УКРАИНСКИХ КАРПАТАХ И ПОЛЕСЬЕ

Picea abies (L.) Karst., доля перекрестного опыления, самоопыление, инбридинг, система скрещивания, изоферментные локусы

Введение

Ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst.) – один из ключевых лесообразующих видов Европы и, в частности, Украины [1, 8, 9]. Интерес к всестороннему изучению этого вида продиктован его эдификаторным положением в лесных биогеоценозах и большим хозяйственным значением [7, 17]. В Украине *P. abies* распространена неравномерно: 98 % ее площадей находится на территории Украинских Карпат, где она является основной лесообразующей породой, и только 2 % – на равнинах Полесья в виде небольших изолированных популяций, которые образуют уникальные темнохвойные сообщества, занесённые в “Зелёную книгу Украины” [2].

Как и большинство хвойных, *P. abies* является преимущественно перекрестноопыляемым видом с высокой долей ауткроссинга (перекрестного опыления) [12]. Возрастание уровня самоопыления и инбридинг у таких видов ведут к снижению их адаптивных и репродуктивных возможностей. Имеющиеся данные о системе скрещивания *P. abies* в западноевропейской части ее ареала свидетельствуют о высокой степени перекрестного опыления в природных популяциях Швеции (89 %) [10] и Италии (95,5 – 96,5 %) [11], а также на лесосеменных плантациях в Финляндии (96 – 100 %) [13] и Швеции (95 – 98 %) [14]. Более низкие оценки доли перекрестного опыления (82,4–84,3 %) отмечены в других итальянских популяциях, что авторы связывают с близкородственными скрещиваниями [6].

Сведения об особенностях системы скрещивания, соотношении доли само- и перекрестного опыления в популяциях *P. abies* из украинской части ареала в литературе отсутствуют.

Цель работы – оценка доли перекрестного опыления и уровней инбридинга *P. abies* в природных популяциях Украинских Карпат и Украинского Полесья по данным изоферментных локусов.

Объекты и методика исследований

В исследованиях использовали семена, собранные с отдельных деревьев в четырех популяциях *P. abies* в Украинских Карпатах и двух популяциях Украинского Полесья в урожайные для этого вида 2002, 2003, 2006 и 2008 годы. В Украинских Карпатах исследованы выборки популяций растений из Львовской (Сколевская популяция) и Ивано-Франковской (Быстрицкие низинная и высотная, Бредулецкая популяции) областей. Сколевская популяция (проанализировано 23 дерева и 158 зародышей семян) находится на высоте 1000 м над уровнем моря (над у. м.), где *P. abies* отличается наилучшим ростом. Быстрицкие низинная (29 деревьев, 188 зародышей) и высотная (30 деревьев, 174 зародыша) популяции произрастают на высотах 700 и 1400 м над у. м. соответственно; Бредулецкая популяция (30 деревьев, 178 зародышей) – 700 м над у. м. В Украинском Полесье исследовали две небольшие «островные» популяции *P. abies* в Волынской и Ровенской областях. В Волынской области выборка взята на территории Маневического лесничества (Маневическая популяция), из нее проанализировано 35 деревьев и 219 зародышей; в Ровенской области – в Любомирском лесничестве (Любомирская популяция, 32 дерева, 215 зародышей). Возраст отобранных для исследований деревьев составил 75 – 150 лет.

Для оценки доли перекрестного опыления в популяциях *P. abies* использовали электрофорез изоферментных локусов в полиакриламидном и крахмальном гелях. Четыре выборки из популяций (Сколевская, Быстрицкая низинная, Маневическая и Любомирская) были проанализированы с помощью четырех – семи (в зависимости от количества мономорфных) локусов,

контролирующих пять ферментных систем: глутаматдегидрогеназу (GDH, К.Ф. 1.4.1.2.), (глутаматоксалоацетаттрансаминазу (GOT, К.Ф. 2.6.1.1.), диафоразу (DIA, К.Ф. 1.8.1.4.), алкогольдегидрогеназу (ADH, К.Ф. 1.1.1.1.) и формиатдегидрогеназу (FDH, К.Ф. 1.2.1.2.) в полиакриламидном геле. Две популяции (Быстрицкая высотная и Бредулецкая) были исследованы с использованием пяти локусов, контролирующих три ферментные системы (GDH, малатдегидрогеназу (MDH, К.Ф. 1.1.1.37) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (6-PGD, К.Ф. 1.1.1.44) в крахмальном геле.

Для определения генотипов материнских растений и зародышей их семян при электрофоретическом разделении использовали ткани гаплоидных мегagamетофитов (эндоспермов) и диплоидных зародышей. Генотип материнского дерева определяли по сегрегации (расщеплению) аллелей среди 7–8 гаплоидных эндоспермов из семян, случайно выбранных из разных шишек. Методики электрофоретического разделения изоферментов в полиакриламидном и крахмальном гелях изложены нами в более ранних публикациях [3, 5]. Долю перекрестного опыления по одно- (t_s) и многолокусным (t_m) оценкам рассчитывали с помощью программы MLTR [16]. Для расчетов показателей генетической изменчивости и уровней инбридинга использовали надстройку для электронной таблицы MS Excel – GenAlex 6.41 [15].

Результаты исследований и их обсуждение

Из восьми изоферментных локусов (*Got-1*, *Got-2*, *Got-3*, *Gdh*, *Fdh*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Adh-2*), использованных в анализе системы скрещивания *P. abies* в полиакриламидном геле, в Сколевской популяции мономорфными оказались четыре (*Got-1*, *Fdh*, *Dia-1*, *Adh-2*), в Любомирской – два (*Fdh*, *Dia-1*), по одному локусу – в Быстрицкой низинной (*Got-1*) и Маневической (*Dia-1*) популяциях. Пять изоферментных локусов (*Gdh*, *Mdh-3*, *Mdh-m*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*), изменчивость которых анализировали в крахмальном геле, были полиморфными как в Быстрицкой высотной, так и в Бредулецкой популяциях. Таким образом, многолокусные оценки доли ауткроссинга в исследуемых популяциях были получены по четырем (Сколевская), пяти (Бредулецкая и Быстрицкая высотная), шести (Любомирская) и семи (Быстрицкая низинная и Маневическая) полиморфным локусам. Следует отметить, что разные локусы, использованные нами в анализе системы скрещивания в популяциях *P. abies*, могут иметь разную адаптивную нагруженность, однако на исследуемой ранней онтогенетической стадии (зародыши покоящихся семян) мы исходим из предположения об их селективной нейтральности.

Доля перекрестного опыления *P. abies* в Украинских Карпатах варьировала в пределах 60,3–76,4 % по однолокусной (t_s) и 60,9–78,3 % – по многолокусной (t_m) оценкам (табл. 1).

Таблица 1. Доля перекрестного опыления и уровни инбридинга *Picea abies* (L.) Karst. в Украинских Карпатах и Полесье

Выборка популяции	Оценка доли ауткроссинга		$\Delta t = t_m - t_s$	Коэффициент инбридинга	
	однолокусная, t_s , $M \pm m$	многолокусная, t_m , $M \pm m$		фактический, F_{IS}	ожидаемый, F_{IS-E}
Украинские Карпаты					
Сколевская	0,690±0,177	0,685±0,193	-0,005	0,260	0,187
Быстрицкая низинная	0,603±0,113	0,609±0,120	0,006	0,179	0,243
Быстрицкая высотная	0,764±0,111	0,783±0,094	0,019	0,187	0,122
Бредулецкая	0,684±0,078	0,721±0,085	0,037	0,249	0,162
Украинское Полесье					
Маневическая	0,653±0,072	0,694±0,075	0,041	0,169	0,181
Любомирская	0,725±0,060	0,730±0,065	0,005	0,223	0,156

Примечание. Здесь и табл. 2: $M \pm m$ – среднее значение \pm ошибка.

Минимальные значения t_s и t_m установлены для Быстрицкой низинной, максимальные – для Быстрицкой высотной популяций, при этом в Быстрицкой низинной ожидаемый уровень инбридинга (24,3 %) был выше наблюдаемого (17,9 %), а в Быстрицкой высотной популяции, наоборот, фактический уровень инбридинга (18,7 %) был выше ожидаемого (12,2 %). В Сколевской популяции как по однолокусной, так и по многолокусной оценкам доля перекрестного опыления составила ~ 69 %. В этой популяции фактический уровень инбридинга оказался довольно высоким (26 %) и превышал ожидаемый (18,7 %). В выборке Бредулецкой популяции доля ауткроссинга была выше, чем в Сколевской и Быстрицкой низинной популяциях. По небольшой разнице значений много- и однолокусных оценок доли ауткроссинга во всех популяциях видно, что основной причиной инбридинга *P. abies* в Украинских Карпатах является самоопыление растений, и только 0,5–3,7 % обусловлено близкородственными скрещиваниями.

В “островных” популяциях *P. abies* Украинского Полесья значения доли перекрестного опыления принципиально не отличались от таковых в Украинских Карпатах (см. табл. 1). В выборке Любомирской популяции они были выше ($t_s = 0,725$; $t_m = 0,730$), чем в Маневической ($t_s = 0,653$; $t_m = 0,694$), как и уровень инбридинга – 22,3 и 16,9 %, соответственно. Так же, как и в карпатских популяциях, вклад близкородственных скрещиваний в инбридинг полесских популяций невелик (0,5 – 4,1 %).

С самоопылением и близкородственными скрещиваниями связывают дефицит гетерозигот в выборках зародышей семян, что отмечено и в наших исследованиях. Во всех анализируемых выборках зародышей семян значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности были значительно ниже, чем в выборках материнских растений (табл. 2). Согласно значениям коэффициента инбридинга, взрослые деревья Быстрицкой низинной, Любомирской и Бредулецкой популяций характеризуются небольшим избытком гетерозигот, соответственно 1,9, 5,6 и 9,5 %. В остальных популяциях *P. abies* выявлен некоторый дефицит гетерозигот: 5,9 % – Маневическая, 7,2 % – Быстрицкая высотная и 10,6 % – Сколевская популяции. В целом же распределения генотипов в выборках материнских растений находятся в состоянии, близком к равновесному, согласно правилу Харди-Вайнберга. Это указывает на пониженную жизнеспособность инбредных зародышей *P. abies*. Следовательно, можно предположить, что если факторы динамики генетической изменчивости не изменились с момента формирования предыдущего поколения зародышей (давших начало нынешнему насаждению в репродуктивной фазе развития), то естественный отбор эффективно удалил потомство от самоопыления и близкородственных скрещиваний.

Таблица 2. Параметры генетической изменчивости в выборках материнских растений (взр) и зародышей (зар) их семян в популяциях *Picea abies* (L.) Karst. Украинских Карпат и Полесья

Выборка популяции	Стадия	N_A	$H_E, M \pm m$	$H_O, M \pm m$	F_{IS}
Украинские Карпаты					
Сколевская	взр	2,0	0,194±0,036	0,130±0,034	0,106
	зар	2,0	0,150±0,012	0,084±0,011	0,260
Быстрицкая низинная	взр	2,5	0,124±0,020	0,118±0,020	-0,019
	зар	2,4	0,104±0,007	0,067±0,007	0,179
Быстрицкая высотная	взр	2,4	0,294±0,034	0,273±0,032	0,072
	зар	2,4	0,247±0,013	0,201±0,012	0,187
Бредулецкая	взр	2,6	0,264±0,031	0,287±0,030	-0,095
	зар	2,6	0,253±0,013	0,190±0,012	0,249
Украинское Полесье					
Маневическая	взр	2,0	0,165±0,021	0,131±0,020	0,059
	зар	2,3	0,151±0,008	0,104±0,007	0,169
Любомирская	взр	2,2	0,123±0,020	0,146±0,020	-0,056
	зар	2,2	0,112±0,007	0,080±0,007	0,223

Примечания. N_A – среднее число аллелей на locus, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, H_E – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга. Приведенные значения показателей внутривидовой изменчивости получены для разных популяций по разным наборам локусов и приводятся здесь как основа для расчета индекса инбридинга.

В ряде выборок материнских растений *P. abies* значения F_{IS} положительны (хотя и не отличаются достоверно от нуля), что указывает на слабый эксцесс (избыток) гомозигот по сравнению с равновесными значениями, и тенденцию к балансирующему отбору, т.е. стабильному равновесию, основанному на преимуществе гетерозигот. Подобные эффекты были неоднократно описаны в популяциях хвойных [4].

Заклучение

Таким образом, хотя *P. abies* является перекрестноопыляемым видом, нами установлены относительно невысокие для хвойных оценки доли ауткроссинга в популяциях *P. abies* из украинской части ареала этого вида. Повышенный инбридинг в карпатских и полесских популяциях *P. abies* обусловлен избыточным самоопылением растений (~ 21–39 %) с небольшой долей близкородственных скрещиваний (0,5–4,1 %). Вероятно, это связано с низкой плотностью популяций и экранирующим эффектом листвы древесных видов, произрастающих в смешанных с елью насаждениях, что приводит к повышению вероятности самоопыления, реализующегося в результате однодомности, ветроопыляемости и отсутствия у хвойных специфических механизмов самостерильности. Инбредные особи эффективно элиминируются отбором в условиях внутривидовой конкуренции, однако, при уменьшении численности и плотности популяций, инбридинг может проследиваться и во взрослой части популяций.

Работы по оценке доли перекрестного опыления в двух популяциях ели европейской с помощью электрофореза изоферментов в крахмальном геле поддержаны ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России» (направление 1.1, Госконтракт 14.740.11.0164) и Программами РАН «Живая природа» (подпрограмма «Динамика и сохранение генофондов») и «Происхождение биосферы и эволюция гео-биоэкологических систем».

1. Голубец М.А. Ельники Украинских Карпат / Михаил Андреевич Голубец. – Киев: Наук. думка, 1978. – 263 с.
2. Мельник В.І. Острівні ялинники Українського Полісся / Віктор Іванович Мельник. – К.: Наук. думка, 1993. – 103 с.
3. Мудрик О.А. Генетична мінливість материнських дерев та зародків їх насіння у різновисотних популяціях *Picea abies* (L.) Karst. в Українських Карпатах / О.А. Мудрик, С.М. Привалихін, Н.М. Пірко, Д.В. Політов // Промышленная ботаника. – 2006. – Вып. 6. – С. 187–192.
4. Политов Д. В. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение V. Анализ системы скрещивания / Д.В. Политов, К.В. Крутовский // Генетика. – 1990. – Т. 26, № 11. – С. 2002–2011.
5. Привалихин С.Н. Генетический контроль изоферментов ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) Украинских Карпат / С.Н. Привалихин, И.И. Коршиков, Н.Н. Пирко [и др.] // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 2. – С. 20–25.
6. Boscherini G. Mating system analysis of two Italian populations of Norway spruce / G. Boscherini, G.G. Vendramin, R. Giannini // J. Genet Breed. – 1993. – Vol. 47. – 45–48.
7. Eriksson G. An introduction to forest genetics / G. Eriksson, I. Ekberg, D. Clapham. – Swedish Univ. of Agric. Sciences (SLU), Uppsala, Sweden. – 2006. – 186 p.
8. Geburek T. Conservation and management of forest genetic resources in Europe / T. Geburek, J. Turok. – Zvolen: Arbora Publishers, 2005. – 693 p.
9. Korshikov I.I. Genetic structure of populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) from Ukrainian Carpathians / I. I. Korshikov, S. N. Privalikhin // Russian Journal of Genetics. – 2007. – Vol. 43, № 12. – P. 1364–1372.
10. Lundkvist K. Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). I. Estimations of genetic variation within and among populations, genetic linkage and a mating system parameters / K. Lundkvist // Hereditas. – 1979. – Vol. 90. – P. 127–143.
11. Morgante M. Effects of stand density on outcrossing rate in two Norway spruce (*Picea abies*) stands / M. Morgante, G.G. Vendramin, P. Rossi // Can. J. Bot. – 1991. – Vol. 69. – P. 2704–2708.
12. Muona O. Effective population sizes, genetic variability and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris* / O. Muona, A. Hariu // Silvae Genetica. – 1989. – Vol. 38, No 5, 6. – P. 221–228.
13. Pakkanen A. Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard / A. Pakkanen, T. Nikkanen, P. Pulkkinen // Scand. J. For. Res. – 2000. – Vol. 15, No 4. – P. 399–404.

14. Paule L. Allozyme frequencies, outcrossing rate and pollen contamination in *Picea abies* seed orchards / L. Paule, D. Lindgren, R. Yazdani // Scand. J. For. Res. – 1993. – Vol. 1. – P. 8–17.
15. Peakall R. GenAlex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
16. Ritland K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci / K. Ritland // Heredity. – 2002. – Vol. 88. – P. 221–228.
17. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) / V. Koski, T. Skroppa, L. Paule [et al.] – Rome: IPGRI. – 1997. – 42 p.

¹ Донецкий ботанический сад НАН Украины

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Получено 10.10.2012

УДК 575.2:575.174 (477)

ДОЛЯ ПЕРЕКРЕСТНОГО ОПЫЛЕНИЯ И УРОВНИ ИНБРИДИНГА *PICEA ABIES* (L.) KARST.
В УКРАИНСКИХ КАРПАТАХ И ПОЛЕСЬЕ

С.Н. Привалихин¹, Е.А. Мудрик², И.В. Макогон¹, И.И. Коршиков¹, Д.В. Политов²

¹ Донецкий ботанический сад НАН Украины

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

С помощью 4–7 изоферментных локусов получены оценки доли перекрестного опыления и уровни инбридинга *Picea abies* в четырех популяциях Украинских Карпат и двух популяциях Украинского Полесья. В карпатских выборках однолокусная оценка ауткроссинга (t_s) варьировала от 0,603 до 0,764, многолокусная (t_m) – от 0,609 до 0,783; уровень инбридинга (F) – от 17,9 до 26 %. В полесских популяциях значения t_s составили 0,653 и 0,725; $t_m = 0,694$ и 0,730; $F = 16,9$ и 22,3 %. Высокий для хвойных уровень инбридинга в популяциях *P. abies* из украинской части ареала обусловлен, главным образом, самоопылением (~ 21–39 %) и относительно небольшой долей близкородственных скрещиваний при перекрестном опылении (0,5–4,1 %).

UDC 575.2:575.174 (477)

OUTCROSSING RATE AND INBREEDING LEVEL IN *PICEA ABIES* (L.) KARST.
IN THE UKRAINIAN CARPATHIANS AND POLESYE

S.N. Privalikhin¹, E.A. Mudrik², I.V. Makogon¹, I.I. Korshikov¹, D.V. Politov²

¹ Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine

² Federal State Institution of Science

Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences

Using 4–7 allozyme loci, we estimated outcrossing rate and inbreeding level in four Norway spruce (*Picea abies*) populations of the Ukrainian Carpathians and two populations of this species of the Ukrainian Polesye. In Carpathian samples single-locus estimates of outcrossing rate (t_s) ranged from 0,603 to 0,764, multilocus estimates (t_m) varied from 0,609 to 0,783, and the levels of inbreeding (F) varied from 17,9 to 26 %. In Polesye populations t_s values were 0,653 and 0,725; $t_m = 0,694$ and 0,730; $F = 16,9$ and 22,3 %. Relatively high, as far as the conifers are concerned, level of inbreeding observed in *P. abies* populations in the Ukrainian range of its distribution is mainly caused by selfing (~ 21–39 %) with an insignificant proportion of consanguineous matings among outcrossed progeny (0,5–4,1 %).