

NURMINSKAYA Y.V., MAXIMOVA L.A., KOPYTINA T.V. ENIKEEV A.G.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,

Russia, 664030, Irkutsk, Lermontov str., 132, e-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

THE ADAPTATION ABILITY LEVEL OF SIX GENERATIONS OF TRANSFORMED TOBACCO PLANTS TO ADVERSE TEMPERATURE

Aims. Were assessed the fluctuating asymmetry level and morphometric parameters of tobacco plants, transformed by gene *ntpII*. Plants were grown under normal (+25 °C) and extremal (+15 °C, +35 °C) conditions. **Methods.** The level of fluctuating was estimated how a difference between left and right halves of the leaf. **Results.** Transgenic plants were more low temperature-sensitive than control ones, these plants demonstrated decreased morphometric parameters and raised fluctuating asymmetry level, T₅ and T₆ generations particularly. **Conclusions.** Coadapted gene complexes are the base of organism adaptation. Low rate of stress adaptation ability of transgenic plants can be the result of transformation procedure, which had perturbed gene complexes work.

Key words: transgenesis, tobacco, adaptation ability.

УДК 575.174.015.3:582.475.2

ОРЕШКОВА Н.В., СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ЕФРЕМОВ С.П.

ФГБУН Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН,

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БОЛОТНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SIBIRICA* ПО ДАННЫМ SSR-МАРКЕРОВ

Сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из основных лесообразующих видов во многих районах Западной Сибири, где кедровые леса занимают 7667 тыс. га, или около 24 % всей площади хвойных лесов [1]. В Западной Сибири *P. sibirica* произрастает на суходолах, включая припоселковые насаждения, а также является типичным представителем болотных и заболоченных экотопов, занимая разнообразные по трофности местообитания. Вопросам дифференциации популяций *P. sibirica* в болотных и суходольных условиях произрастания посвящены лишь несколько работ [2–4]. Полученные к настоящему времени данные оставляют ряд вопросов относительно экотопической дивергенции болотных и суходольных популяций сосны кедровой сибирской и их возможной генетической дифференциации. В настоящей работе приводятся данные по оценке генетической изменчивости, структуре и дифференциации популяций *P. sibirica*, произрастающих в болотных и суходольных экотопах южно-таежной подзоны Западной Сибири, основанные на исследовании полиморфизма ДНК с использованием SSR-маркеров ядерного генома.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили выборки из 4 популяций сосны кедровой сибирской, произрастающих в южно-таежной подзоне Западной Сибири (Томская область): междуречье Иксы и Яри, суглинистый суходол, кедровник елово-пихтовый низкотравно-зеленомошный (56°54г.ш., 83°04г.д.); пос. Мельниково, супесчаный суходол, припоселковый кедровник осочково-разнотравный (56°33г.ш., 84°04г.д.); долина р. Жуковка, евтрофное болото, кедровник елово-лиственнично-пихтовый разнотравно-гипновый (56°20г.ш., 84°34г.д.); Междуречье Иксы и Бакчара, олиготрофное болото, сосняк сфагново-кустарничково-пушицевый в сочетании с куртинами и одиночными деревьями кедра (56°53г.ш., 82°40г.д.).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены из 100–200 мг высушенной хвои, собранной с 30 деревьев в каждой из 4 популяций (всего 120 образцов). Выделения проводили по протоколу для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ-метод) [5]. В качестве генетических маркеров в работе использовали ядерные микросателлитные локусы. Выделенную ДНК использовали для

проведения ПЦР с шестью парами праймеров (таблица), разработанных для сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) и апробированных для работы с *P. sibirica* [6]. Для ПЦР использовали набор реагентов для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген». Амплификацию отобранных ядерных микросателлитных локусов проводили при следующем режиме: предварительная денатурация ДНК 94 °С – 15 мин; далее 30 циклов, включающие 30 сек. плавления при 94 °С, отжиг праймеров 30 сек. при 54 °С и 50 сек. элонгации при 72 °С. Завершающий цикл элонгации проходил при 72 °С в течение 15 мин. Электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 6 %-м полиакриламидном геле с использованием Трис-EDTA-боратного электродного буфера в камерах для вертикального электрофореза при напряжении 300 В в течение 2–2,5 ч. Окрашивание гелей проводили раствором бромистого этидия с дальнейшей визуализацией продуктов амплификации в УФ-свете. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанной рестриктазой *Hpa II*. Для выявления и исключения возможных вариантов ошибок генотипирования микросателлитных локусов использовали программу MICRO-SHECKER [7], при помощи которой провели оценку частот возможных нуль-аллелей в локусах и скорректировали число гомозиготных генотипов, а также частоту амплифицированных аллелей в популяциях. Исправленные генотипы четырех исследованных популяций сосны кедровой сибирской использовали для проведения расчета основных показателей внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости с помощью программы GenAlEx 6.41 [8]. Для анализа связи между географическими и генетическими расстояниями использовали тест Мантелла [9].

Результаты и обсуждение

Анализ 6 ядерных микросателлитных локусов в 4 популяциях *P. sibirica* показал, что все локусы оказались полиморфными. Наиболее высокополиморфным во всех 4 исследованных популяциях являлся локус *Pc 1b*, у которого наблюдалось 9 аллельных вариантов. Высокую изменчивость показали также локусы *Pc 7*, *Pc 22*, в изученных популяциях у них были идентифицированы 5 и 6 аллелей, соответственно. Самой низкой изменчивостью характеризовался локус *Pc 35* – всего 2 аллеля. Примеры электрофореграмм, представляющие изменчивость всех исследованных микросателлитных локусов, приведены на рис. 1.

При помощи программы MICRO-SHECKER были выявлены скрытые нуль-аллели в локусе *Pc 1b* во всех 4-х исследованных популяциях *P. sibirica* (К-1 – К-4), а также в локусах *Pc 7* и *Pc 22* в популяции с олиготрофного болота (К-4). Всего при анализе 4 популяций *P. sibirica* было выявлено 30 аллельных вариантов. Частоты скрытых нуль-аллелей были рассчитаны исходя из предположения о том, что популяции находятся в равновесном состоянии, согласно правилу Харди-Вайнберга [10]. В изученных популяциях *P. sibirica* выявленные ядерные микросателлитные локусы отличались по частоте встречаемости и составу аллелей. Наибольшее аллельное разнообразие наблюдается в популяции данного вида с олиготрофного болота (К-4).

Для выявления уровня генетического разнообразия в каждой из 4 исследованных популяций *P. sibirica* были рассчитаны основные показатели генетической изменчивости. Расчет основных параметров генетической изменчивости показал, что включенные в исследование популяции *P. sibirica* различаются по уровню генетического разнообразия.

Таблица. Характеристика ядерных микросателлитных локусов, отобранных для анализа генетической изменчивости *Pinus sibirica*

Локус	Мотив	Температура отжига, °С	Размер фрагмента	N_A	Литература
<i>Pc 1b</i>	(GT) ₁₉	54	174–212	9 (9)*	Salzer et al., 2009
<i>Pc 7</i>	(CT) ₆ (AT) ₄ (GT) ₂₅	54	354–378	7 (5)*	
<i>Pc 18</i>	(TG) ₁₂	54	152–158	4 (4)*	
<i>Pc 22</i>	(CA) ₇ TA(CA) ₁₂ (TA) ₂	54	342–354	5 (6)*	
<i>Pc 23</i>	(TG) ₆ CG(TG) ₂	54	205–235	4 (4)*	
<i>Pc 35</i>	(GTT) ₇	54	152–162	2 (2)*	

Примечание: *число аллелей в ядерных микросателлитных локусах, выявленных в нашей работе.

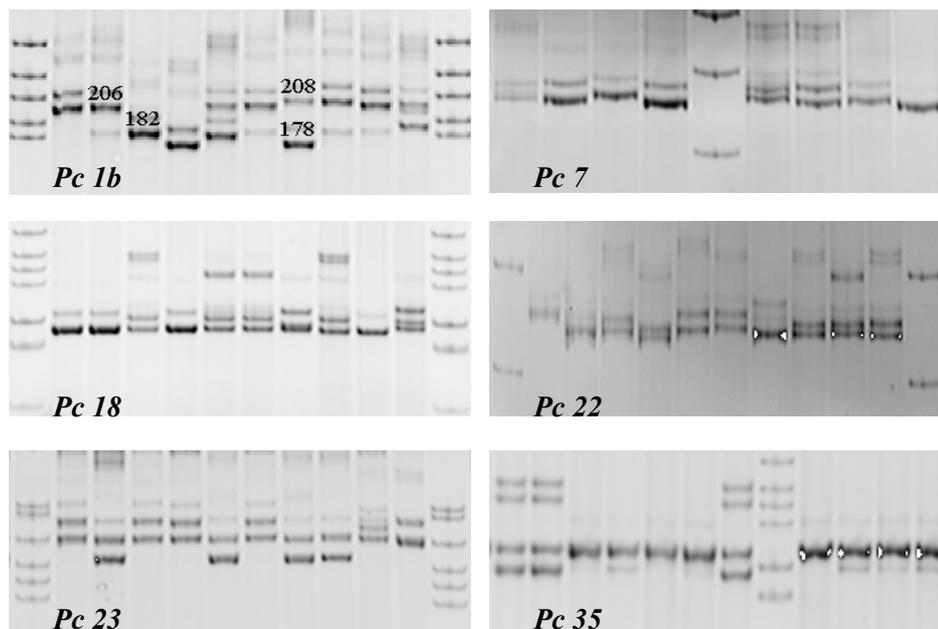


Рис. 1. Электрофореграммы ядерных микросателлитных локусов *Pc 1b*, *Pc 7*, *Pc 18*, *Pc 22*, *Pc 23*, *Pc 35* у сосны кедровой сибирской. Значения 178, 182, 206, 208 на электрофореграмме *Pc 1b* – пример обозначения аллелей по длине амплифицируемого фрагмента ДНК

Самые высокие значения почти всех параметров генетической изменчивости ($N_A = 5,000$; $N_E = 3,122$; $H_E = 0,611$; $F = 0,107$), за исключением наблюдаемой гетерозиготности ($H_O = 0,550$), были выявлены у популяции *P. sibirica* с олиготрофного болота (К-4). Самый высокий уровень наблюдаемой гетерозиготности ($H_O = 0,583$) выявлен в популяции *P. sibirica* из припоселкового кедровника (К-2). В популяциях *P. sibirica* с суходола (К-1) и евтрофного болота (К-3) наблюдаемая гетерозиготность составила $H_O = 0,506$ и $H_O = 0,483$, соответственно. В целом, значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о достаточно высоком в среднем уровне генетического разнообразия *P. sibirica* в болотных и суходольных экотопах, и близки к аналогичным показателям, приведенным для кедровых сосен [6, 11].

В болотных (К-3, К-4) и суходольной (К-1) популяциях *P. sibirica* выявлен дефицит гетерозиготных генотипов. Одним из объяснений дефицита гетерозигот и повышенного уровня инбридинга ($F = 0,107$) в популяции *P. sibirica* с олиготрофного болота (К-4) может служить наличие фенологически и территориально обусловленного фактора ее репродуктивной изоляции от насаждений данного вида на суходолах. Дефицит гетерозигот, составляющий в популяции

P. sibirica с суходола (К-1) $F = 0,057$ и в популяции данного вида с евтрофного болота (К-3) $F = 0,045$, можно объяснить возможным наличием экранирующего эффекта, создаваемого другими видами хвойных и затрудняющего обмен пыльцой между деревьями в данных высокополнотных смешанных насаждениях. Популяция припоселкового кедровника (К-2), напротив, испытывает избыток гетерозигот ($F = -0,091$), что, вероятно, является результатом длительной плюсовой селекции, проводимой населением в данном насаждении, сформировавшемся вблизи поселка при содействии местных жителей путем вырубki низкопродуктивных особей *P. sibirica* и удаления примеси сопутствующих древесных видов, изначально присутствовавших в составе коренного лесного сообщества.

Анализ популяционной структуры *P. sibirica* с помощью индексов фиксации Райта [12] показал, что в среднем каждое дерево обнаруживает почти 4 %-ный дефицит гетерозиготных генотипов ($F_{IS} = 0,037$) относительно популяции и 6 %-ный дефицит гетерозигот ($F_{IT} = 0,061$) относительно вида в целом. Полокусные значения F_{IS} и F_{IT} показывают, что наиболее значимый дефицит гетерозигот наблюдается в локусах *Pc 1b*, *Pc 7*, *Pc 23*, *Pc 18*.

Коэффициент инбридинга популяций относительно вида в целом (F_{ST}), отражающий

степень подразделенности популяций, варьирует от 0,007 (P_c 7) до 0,035 (P_c 22), составляя в среднем 0,024. Это свидетельствует о том, что только 2,4 % выявленной генетической изменчивости у изученных популяций *P. sibirica* распределяется между популяциями. Внутри популяций сосредоточено около 97,6 % всего генетического разнообразия. Результаты χ^2 теста свидетельствуют о том, что статистически высокодостоверная гетерогенность аллельных частот в исследованных популяциях наблюдается по трем (P_c 1b, P_c 18, P_c 22) из шести изученных локусов.

Оценка степени генетических различий между исследованными популяциями *P. sibirica* с помощью генетических дистанций (D_N) М. Нея [13], показала, что популяции данного вида с суходола (К-1) и евтрофного болота (К-3) наиболее близки по генетической структуре ($F_{ST} = 0,012$; $D_N = 0,028$). Дифференциация их с популяцией из припоселкового кедровника (К-2) оказалась чуть выше и составила $F_{ST} = 0,014$; $D_N = 0,031$. Максимальные же различия в генетической структуре выявлены между популяцией *P. sibirica* с олиготрофного болота (К-4) и тремя другими ($F_{ST} = 0,019$; $D_N = 0,053$). Установленный уровень дифференциации включенных в исследование популяций сосны кедровой сибирской наглядно показывает расположение популяций на плоскости двух координат (рис. 2). Согласно тесту Мантела

($r = 0,274$, $P = 0,31$) корреляция значений генетического расстояния (D_N) с географическим отсутствует.

Выводы

Таким образом, в результате исследования полиморфизма ДНК болотных и суходольных популяций *P. sibirica* выявлено их значительное генетическое разнообразие по ядерным микросателлитным локусам и высокая степень генетической дифференциации. Существенная генетическая неоднородность исследованных популяций *P. sibirica* связана с контрастными различиями условий водно-минерального питания, и, вследствие этого, изменением векторов естественного отбора на олиготрофных, евтрофных болотах и суходолах, а также влиянием многолетней плюсовой селекции в припоселковом кедровнике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития». Авторы благодарят научного руководителя центра геномных исследований Сибирского Федерального Университета (г. Красноярск), в.н.с. Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (г. Москва), проф. Техасского агро-механического университета (США) и Гёттингенского университета (Германия) К.В. Крутовского за консультации и помощь в интерпретации материала.

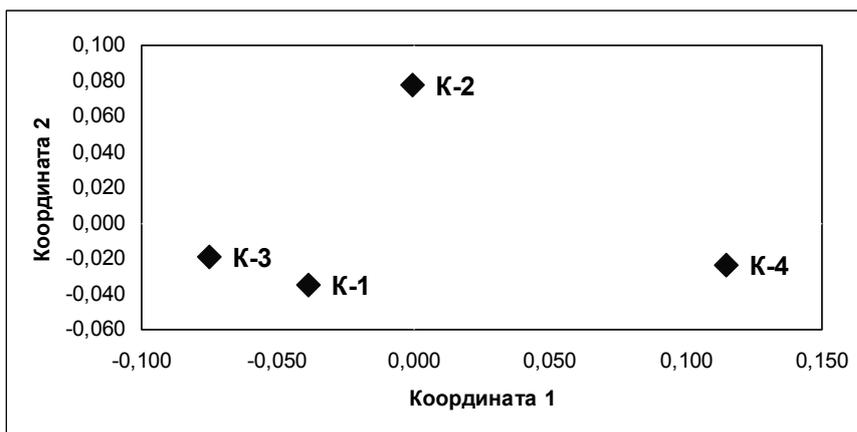


Рис. 2. Проекция изученных популяций *P. sibirica* на плоскости двух координат по данным PCA-анализа матрицы генетических расстояний М. Нея

Литература

- Ефремов С.П., Ефремова Т.Т., Блойтин В. Биологическая продуктивность и углеродный пул фитомассы лесных болот Западной Сибири // Сибирский экологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 29–44.
- Авров Ф.Д. Генетический обмен между насаждениями кедр сибирского в различных лесорастительных условиях // Проблемы кедр. Выпуск 5. Экология кедровых лесов / Под ред. В.Н. Воробьева. Томск: Изд-во ИЭПК СО РАН, 1992. – С. 61–68.

3. Велисевич С.Н., Петрова Е.А., Бендер О.Г., Зотикова А.П. Формирование структуры популяций сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) в заболоченных экотопах юга Томской области // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2008. – № 1. – С. 13–22.
4. Седелникова Т.С., Муратова Е.Н. Кариологические особенности сосны кедровой сибирской // Экология. – 2002. – № 5. – С. 323–328.
5. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. – 1996. – 92, № 6. – P. 673–679.
6. Salzer K., Sebastiani F., Gugerli F., Buonamici A., Vendramin G.G. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. // Molecular Ecology Resources. – 2009. – № 9. – P. 858–861.
7. Van Oosterhout C, Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecology Notes. – 2004. – № 4. – P. 353–358.
8. Peakall R., Smouse P.E. GenAEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. – 2006. – 6, № 1. – P. 288–295.
9. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Research. – 1967. – 27. – P. 209–220.
10. Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications // Ann. Hum. Genet. – 1992. – 56. – P. 45–57.
11. Мудрик Е.А., Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Жулина Е.В., Политов Д.В. Генетическая изменчивость и доля перекрестного опыления *Pinus cembra* L. в Украинских Карпатах и Австрийских Альпах по аллозимным и микросателлитным локусам // Вестник МГУЛ. Лесной вестник. – 2012. – 84, № 1. – С. 112–117.
12. Guries R.P., Ledig F.T. Gene diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. – 1982. – 36. – P. 387–402.
13. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. – 1972. – 106. – P. 283–291.

ORESHKOVA N.V., SEDEL'NIKOVA T.S., PIMENOV A.V., EFREMOV S.P.

Sukachev Institute of Forest SB RAS,

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

GENETIC DIFFERENTIATION OF BOG AND DRY LAND POPULATIONS OF *PINUS SIBIRICA* ON SSR-MARKER DATA

Aims. The evaluation of population structure of bog and dry land populations of Siberian pine (*P. sibirica*) in Western Siberia was studied by markers of a nuclear genome. **Methods.** Six pairs of nuclear microsatellite loci were used for this analysis. 30 allelic variants were detected in 120 individuals of four populations of *P. sibirica*. **Results.** The most essential genetic distinctions were observed between of *P. sibirica* population from oligotrophic bog and the group of populations from a dry land, eutrophic bog and near settlement *P. sibirica* forest ($F_{ST} = 0.019$; $D_N = 0.053$). The differentiation of West Siberian populations of *P. sibirica* on SSR markers exceeded 2.4 % ($F_{ST} = 0.024$). **Conclusions.** The studied populations differ on the genetic structure due to various environmental conditions of ecotopes.

Key words: populations of *Pinus sibirica*, microsatellite loci, genetic differentiation.

УДК 575.167 + 57.043

СОЗІНОВ І.О.¹, КОЗУБ Н.О.^{1, 2}, БІДНИК Г.Я.^{1, 2}, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.^{1, 2}, КАРЕЛОВ А.В.^{1, 2}, БЛЮМ Я.Б.², СОЗІНОВ О.О.^{1, 2}

¹ *Інститут захисту рослин НААН,*

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

² *ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,*

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ НА ОЗНАКИ ПРОДУКТИВНОСТІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ГЕНОТИПУ І УМОВ ВИРОЩУВАННЯ

Відомо, що гамма-опромінення у високих дозах (150–200 Гр і більше) сухих зерен приводить до пригнічення показників

фізіологічного стану рослин, яке проявляється, зокрема, у зниженні ознак продуктивності [1, 2]. У дослідженнях різних авторів показано