

УДК 575:582.47

В.О. КРАМАРЕЦЬ¹, Р.Т. ГУТ², А. ДЗЯЛУК³

ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ЯЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ (*PICEA ABIES* (L.) H. KARST.) В УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТАХ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ АНАЛІЗУ ЯДЕРНОЇ ДНК

Подано результати дослідження генетичної структури та мінливості ялини звичайної із семи місць зростання на території Українських Карпат з використанням мікросателітів ядерної ДНК. Із збільшенням географічної відстані між популяціями ступінь генетичної диференціації за частотою алелей зростає, однак ця різниця є статистично не істотною. Частка міжпопуляційної генетичної мінливості становить всього 2%, а внутрішньопопуляційної – 98%. Усі обстежені популяції походять з одного історичного рефугіуму та належать до одної метапопуляції.

Ключові слова: ялина європейська, ядерна ДНК, популяційно-генетична мінливість, Українські Карпати.

Вступ. Ялина європейська (*Picea abies* (L.) H. Karst.) поширена у Швейцарських і Баварських Альпах, у горах Франції, на Польській рівнині, на Північних Балканах, Прибалтиці, Білорусії і в Українських Карпатах. Утворює ліси чисті або мішані з листяними чи хвойними породами.

Однією з причин погіршення санітарного стану похідних ялинників (створених на місці букових та ялицевих лісів) на території Українських Карпат вважається їх не аборигенне походження. Створення лісових культур ялини на території Карпат має тривалу історію – висівання та садіння цієї породи почали практикувати з кінця XIX ст. Особливо масово ялинники створювали після сильних вітровалів 1868-1885 рр. [3]. У період Австро-Угорщини на місці зрубаних автохтонних лісів висівали або висаджували ялину, насіння для якої було отримане з різних регіонів Європи [3, 5]. Фірми, що торгували насінням ялини, заготовляли його без врахування географічного походження материнських деревостанів. Все це призвело до того, що навіть у межах одного насадження трапляються різні внутрішньовидові форми ялини за будовою кори, галузненням, формою насінних лусок шишок тощо [3].

Вивчення генетичної структури ялини з допомогою молекулярних ДНК-маркерів дає важливу інформацію у вирішенні завдань із збереження та підтримання біорізноманіття лісових екосистем. Під час дослідження філогеографічних особливостей популяцій рослин застосовують генетичні маркери, які є якісними характеристиками організмів. За допомогою генетичних маркерів вивчають генетичну мінливість та процеси гібридизації, аналізу-

ють приплив генів, ідентифікують організми, досліджують та картують локуси, які характеризують кількісні ознаки особин. Такі маркери повинні мати високий поліморфізм (тобто – велику кількість алелів на локус), характеризуватися селекційною нейтральністю і кодомінантністю [9, 16].

Дослідження популяційно-генетичної структури деревних порід (зокрема й на території Українських Карпат) найчастіше проводили з використанням генетичного аналізу ізоферментів, мітохондріальних та хлоропластних ДНК [1, 2, 4, 6, 13]. Упродовж останніх років для таких аналізів використовують і маркери ядерної ДНК, які є більш складними для роботи, однак відображають демографічні процеси в популяціях багатьох видів рослин, зокрема і ялини європейської [8].

Об'єкти та методика досліджень. Дослідження молекулярно-генетичних особливостей ялини звичайної здійснювали у природних і штучних ценопопуляціях цієї породи на території Українських Карпат.

Матеріал для генетичних досліджень ялини європейської відбирали у старовікових деревостанах (віком понад 120 років), за винятком похідного ялинника, розташованого на території НПП «Сколівські Бескиди» (Сколівське лісництво, уроч. Павлів потік кв. 12, вид. 7). Вік цього деревостану становить 56 років. Для виділення сумарної ДНК використовували свіжу хвою.

Хвою із зібраних пагонів обривали, подрібнювали, готували середній зразок і зберігали за температури -80°C до використання. Біля 50 мг цього рослинного матеріалу розтирали у рідкому азоті.

¹ **КРАМАРЕЦЬ Володимир Олександрович** – член-кореспондент Лісівничої академії наук України, канд. с.-г. наук, доцент, Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна. E-mail: v_kramarets@ukr.net

² **ГУТ Роман Тарасович** – член-кореспондент Лісівничої академії наук України, доктор біол. наук, професор кафедри лісівництва, Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна. E-mail: rgoutmollab@ukr.net

³ **ДЗЯЛУК Артур** – доктор, університет Казимира Великого в Бидгощі, кафедра генетики, м. Бидгощ, Польща. E-mail: dzialuk@ukw.edu.pl

Сумарну ДНК ізолювали з допомогою комерційних наборів Qiagen DNeasy Plant Mini Kit згідно з інструкцією виробника (фірми «Qiagen»). Після ізоляції якість і кількість ДНК визначалась на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf). Потім готували робочий розчин з концентрацією 10 нг/мл. Підготовлені таким чином проби зберігали за температури -20°C до моменту виконання реакції ПЦР. Як генетичні маркери використано мікросателіти ядерної ДНК: EATC1B02, EaTC1D02, EATC2B02 [19], PAAC23 [11], SPAC1F7, SpAGC1, SpAGC2, SpAGG3 [15]. Генетичні аналізи виконували в лабораторії кафедри генетики Університету Казимира Великого в м. Бидгощ (Польща). Для статистичного опрацювання

результатів генетичних аналізів використовували комплекс підпрограм GenAlEx 6 [10, 14].

Результати досліджень. Віддалі між популяціями, в яких відбиралися зразки для генетичний аналізів, змінюються від 5 км (дві популяції із Сколівського лісництва НПП «Сколівські Бескиди») до 156 км (між популяціями у Мшанському лісництві ДП «Осмолодське ЛГ») та в уроч. Павлів потік НПП «Сколівські Бескиди»). Як видно з табл. 1, на відстані до 50 км між собою розташовані п'ять обстежених популяцій ялини, 51-100 км – вісім популяцій, 101-150 – шість популяцій, більше 150 км – дві популяції.

Таблиця 1

Матриця географічних відстаней між популяціями, км

Ценопопуляція	Мшанське л-во ДП «Осмолодське ЛГ»	Собільське л-во ДП «Вигодське ЛГ»	НПП «Сколівські Бескиди», гора Лопата	Говерлянське л-во ДП «Рахівське ЛДГ»	Горганське ПНДВ ПЗ «Горгани»	полон. Пожижевська НПП «Карпатський»	НПП «Сколівські Бескиди», уроч. Павлів потік
ДП «Осмолодське ЛГ», Мшанське л-во	0,0						
ДП «Вигодське ЛГ», Собільське л-во	129	0,0					
НПП «Сколівські Бескиди», гора Лопата	151	22	0,0				
ДП «Рахівське ЛДГ» Білотисянське л-во	61	113	133	0,0			
ПЗ «Горгани», Горганське ПНДВ	96	62	79	57	0,0		
НПП «Карпатський», полонина Пожижевська	71	98	117	17	40	0,0	
НПП «Сколівські Бескиди», уроч. Павлів потік	156	27	5	137	83	122	0,0

Розташування дослідних об'єктів у системі географічних координат показано на рис. 1. Найбільш близькими за розташуванням є популяції ялини з території НПП «Сколівські Бескиди» (гора Лопата та уроч. Павлів потік) та Собільського лісництва ДП «Вигодське ЛГ». Іншу досить близьку за розташуванням групу формують популяції з Білотисянського лісництва ДП «Рахівське ЛДГ», околиць полонини Пожижевської на території НПП «Карпатський» та з Горганського ПНДВ ПЗ «Горгани». Найбільш віддаленою від обох груп є популяція ялини з Мшанського лісництва ДП «Осмолодське ЛГ».

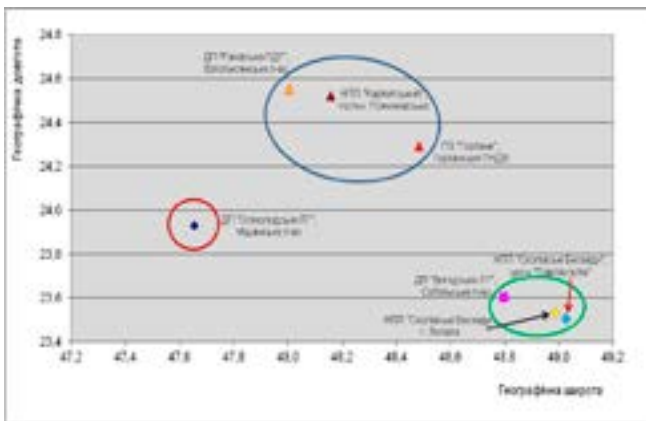


Рис. 1. Розташування дослідних об'єктів у системі географічних координат

Оцінку істотності впливу географічної віддалі на генетичну структуру популяції виконали з допомогою тесту Мантеля. Для аналізу використали дані про географічну віддаль між популяціями, яку порівнювали із генетичною дистанцією Нея.

Значення генетичної дистанції Нея коливається від 0,009 до 0,136. Із збільшенням географічної відстані між популяціями зростають і значення генетичної дистанції Нея. Однак ця тенденція статистично не істотна – $p = 0,192 (> 0,05)$. Отже, географічна віддаль між обстеженими популяціями не впливає істотно на їх генетичні особливості.

За результатами аналізу молекулярних варіацій (відхилень) встановлено, що різниця між аналізованими популяціями становить тільки 2%, значна більша генетична мінливість спостерігається в середині популяцій – 98% (рис. 2). Приплив давніх (історичних) генів в обстежених популяціях ялини є високим – Nm становить 10,788. Можна зробити висновок, що всі обстежені популяції ялини походять з одного історичного рефугіуму.

Всі обстежені ялинники належать до однієї метапопуляції та є її складовими частинами (фрагментами, підпопуляціями) які забезпечують достатні умови для розвитку і відновлення ялинових лісів. Метапопуляція ялини може існувати тривалий час, якщо темпи природного відновлення її лісів будуть переважати над швидкістю локального відмирання [18].

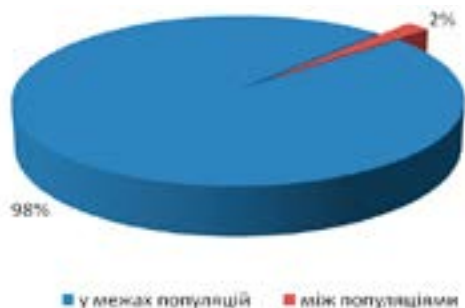


Рис. 2. Відсотки молекулярних відхилень

Малу генетичну різницю між популяціями можна пояснити значним припливом генетичного матеріалу та його обміном між обстеженими популяціями, що, на нашу думку, спричинено як природними, так і антропогенними чинниками – лісові культури ялини на заходів України створюються тривалий час (понад 100 років), при цьому використовується насіння різного походження (з різних регіонів, без врахування висотної поясності), що сприяє широкому обміну генетичним матеріалом.

Дані про показники поліморфізму в досліджених популяціях ялини звичайної наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Показники генетичного поліморфізму в досліджених популяціях ялини європейської (середнє значення та стандартна помилка)

Популяція	Кількість алелів (Na)	Кількість ефективних алелів (Ne)	Інформаційний індекс Шеннона (I)	Наявна гетерозиготність (No)	Очікувана гетерозиготність (He)	Об'єктивно очікувана гетерозиготність (UHe)
ДП «Осмолодське ЛГ», Мшанське л-во	10,750 ±0,996	6,035 ±0,879	1,976 ±0,130	0,566 ±0,068	0,806 ±0,033	0,821 ±0,033
ДП «Вигодське ЛГ», Собільське л-во	9,875 ±1,231	5,478 ±1,064	1,812 ±0,193	0,526 ±0,086	0,751 ±0,053	0,766 ±0,054
НПП «Сколівські Бескиди», Сколівське л-во, гора Лопата	9,375 ±1,101	4,832 ±0,863	1,776 ±0,120	0,487 ±0,081	0,763 ±0,026	0,778 ±0,026
ДП «Рахівське ЛДГ» Білотисянське л-во	10,375 ±0,944	4,728 ±0,917	1,778 ±0,139	0,582 ±0,064	0,741 ±0,038	0,755 ±0,039
ПЗ «Горгани», Горганське ПНДВ	10,250 ±1,578	4,415 ±0,832	1,737 ±0,170	0,556 ±0,068	0,727 ±0,040	0,741 ±0,041
НПП «Карпатський», полонина Пожижевська	10,500 ±0,982	4,746 ±1,051	1,750 ±0,165	0,545 ±0,072	0,720 ±0,048	0,734 ±0,049
НПП «Сколівські Бескиди», Сколівське л-во, уроч. Павлів потік	10,750 ±1,292	5,351 ±0,955	1,838 ±0,181	0,504 ±0,087	0,755 ±0,053	0,771 ±0,054
Середнє і стандартна помилка для всіх популяцій	10,268 ±0,425	5,084 ±0,343	1,810 ±0,058	0,538 ±0,027	0,752 ±0,016	0,766 ±0,016

Середня кількість алелів в обстежених популяціях коливалася від 9,375 у популяції з гори Лопата (НПП «Сколівські Бескиди») до 10,750 в уроч. Павлів потік (НПП «Сколівські Бескиди») та Мшанському л-ві (ДП «Осмолодське ЛГ»). Середнє значення цього показника для всіх популяцій становило 10,268. Швидкість збільшення пристосування вища в тих популяціях, де є більша кількість різних алелів.

Кількість ефективних алелів (Ne) характеризує кількість алелів, які могли б бути в популяції, якщо б усі алелі мали однакову частоту [16]. Серед обстежених популяцій, найнижча кількість ефективних алелів виявлено в Горганському ПНДВ, а найвищу – в Мшанському л-ві.

Інформаційний індекс Шеннона (I) відображає різноманітність у середині популяції та надає більшого значення рідкісним алелям [16]. Вищі значення цього індексу свідчать про вищу генетичну різноманітність популяції та вказують на зростання невизначеності та неоднорідності генетичної структури. В обстежених популяціях значення інформаційного індексу Шеннона були досить близькими та коливалися від 1,737 – у популяції із Горганського ПНДВ до 1,838 – у популяції із уроч. Павлів потік (НПП «Сколівські Бескиди») за середнього значення цього індексу 1,810.

Наявна гетерозиготність (No) показує, яку частку в популяції становлять особини гетерозиготні по досліджених маркерах. В обстежених популяціях ялини цей показник коливається від 0,487 (НПП «Сколівські Бескиди, гора Лопата») до 0,582 (Білотисянське л-во ДП «Рахівське ЛДГ»).

Очікувана гетерозиготність (He) дає змогу оцінити рівень генетичної мінливості в популяції. Середнє значення очікуваної гетерозиготності для обстежених популяцій становить 0,752, та коливається в межах 0,720-0,806. Найвищу генетичну мінливість за цим показником виявлено в популяції з Мшанського лісництва ДП «Осмолодське ЛГ».

За коефіцієнтами генетичної дистанції Нея методом Neighbor-Joining [17] побудовано дендрограму подібності семи популяцій ялини європейської за мікросателітами ядерної ДНК (рис. 3).

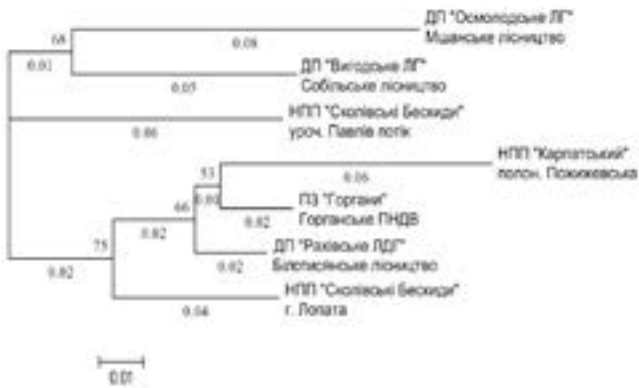


Рис. 3. Дендрограма подібності популяцій ялини європейської за коефіцієнтами генетичної дистанції Нея

Найбільш близькими виявилися популяції ялини з околиць полонини Пожижевської (НПП «Карпатський») та Говерлянського ПНДВ (ПЗ «Горгани»), близькими до них є популяції з Білотисянського лісництва (ДП «Рахівське ЛДГ»). Окремий кластер утворили популяції із Мшанського лісництва (ДП «Осмолодське ЛГ») та Собільського лісництва (ДП «Вигодське ЛГ»). Досить значну різницю виявлено між популяціями ялини із Сколівського лісництва НПП «Сколівські Бескиди», незважаючи на те що ці популяції розташовані найближче.

Висновки. За результатами аналізу ядерної ДНК ялини європейської із семи популяцій на території Українських Карпат встановлено, що географічна відстань не впливає істотно на генетичні особливості ялини в обстежених популяціях. Усі обстежені популяції походять з одного історичного рефугіуму та характеризуються високою внутріпопуляційною і низькою міжпопуляційною мінливістю (відсоток молекулярних відхилень у межах популяції – 98%, між популяціями – 2%).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аналіз популяційно-генетичної мінливості п'яти видів хвойних Українських Карпат / І.І. Коршиков, Я.В. Пірко, Н.М. Пірко [та ін.] // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2004. – Вып. 36. – С.108-115.
2. Генетический контроль изоферментов ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из Украинских Карпат / С.Н. Привалихин, И.И. Коршиков, Н.Н. Пирко [и др.] // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40. – № 2. – С. 20-26.
3. Голубец М. А. Ельники Украинских Карпат : моногр. / Голубец М.А. – К.: Наук. думка, 1978. – 264 с.
4. Коршиков И. И. Популяционно-генетическая структура ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) в Украинских Карпатах / И.И. Коршиков, С.Н. Привалихин // Генетика. – Т. 43. – № 12. – 2007. – С. 1627-1636.
5. Лесное хозяйство и лесная промышленность западных областей Украинской ССР / В.П. Чекин,

З.Ю. Герушинский, Э.Я. Оксанич, А.П. Ивашова. – Львов : Изд-во Львов. ун-та, 1967. – 144 с.

6. Особенности популяционно-генетической структуры ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) Украинских Карпат и Полесья / И.И. Коршиков, С.Н. Привалихин, И.В. Макогон [и др.] // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42. – № 6. – С. 19-25.

7. Vendramin G.G. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae / G.G. Vendramin, L. Lelli, P. Rossi, M. Morgante // Molecular Ecology. – 1996. – Vol. 5. – P. 595-598.

8. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies* / M.M. Tollefsrud, J.H. Sonstebo, C. Brochmann, O. Johnsen, T. Skroppa, G.G. Vendramin // Heredity. – 2009. – 102. – P. 549-562.

9. Dzialuk A. Molekularne markery DNA jako narzędzie badawcze genetyki drzew leśnych. / A. Dzialuk, J. Burczyk // Sylwan. – 2001. – R. 145. – Nr 8. – S. 67-83.

10. Flanagan N.S. A guide to GenA1Ex 6©. Genetic Analysis in Excel / N.S. Flanagan. – Canberra : The Australian National University Press, 2005. – 94 p. - <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenA1Ex/>

11. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences / I. Scotti, F. Magni, R. Fink, W. Powell, G. Binelli, P.E. Hedley // Genome : National Research Council Canada. – 2000. – Vol. 43 (1). – P. 41-46.

12. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics / M. Nei. – New York : Columbia University Press, 1987. – 512 p.

13. Nowakowska J. Zróżnicowanie genetyczne wybranych pochodzeń sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z pogranicza polskiego i ukraińskiego na podstawie analizy mitochondrialnego DNA / J. Nowakowska, R. Gout, Yu. Verbovytska, J. Bieniek // Leśne Prace Badawcze. – 2005. – № 2. – S. 141-147.

14. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 6, 2006. – P. 288-295.

15. Pfeiffer A. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.) / A. Pfeiffer, A.M. Olivieri, M. Morgante // Genome. 1997. – Vol. 40(4). – P. 411-419.

16. Sakowicz T. Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin / T. Sakowicz // Postępy biologii komórki. 1997. – Tom 24, suplement nr 9. – S. 81-92.

17. Studier J. A Note on the Neighbor-Joining Algorithm of Saitou and Nei / J. Studier, K.J. Keppler // Molecular Biology and Evolution. – 1988, Vol. 5, No.6. – P.729-731.

18. Turner M.G. Landscape Ecology in Theory and Practice: Pattern and Process / M.G. Turner, R.H. Gardner, R.V. O'Neill. – New York : Springer-Verlag, 2001. – 406 p.

19. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers / I. Scotti, F. Magni, G.P. Paglia, et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – Vol. 106(1). – P. 40-50.

В.А. Крамарец, Р.Т. Гут, А. Дзялук

**ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ
(*PICEA ABIES* (L.) H. KARST.)
В УКРАИНСКИХ КАРПАТАХ
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА ЯДЕРНОЙ ДНК**

Поданы результаты исследования генетической структуры и изменчивости ели обыкновенной из 7 местопроизрастаний на территории Украинских Карпат с использованием микросателлитов ядерной ДНК. При увеличении географического расстояния между популяциями степень генетической дифференциации по частоте аллелей возрастает, однако эти различия статистически не существенны. Межпопуляционная генетическая изменчивость составляет всего 2%, а внутривидовая – 98%. Все обследованные популяции ели происходят из одного исторического рефугиума и относятся к одной метапопуляции.

Ключевые слова: ель европейская, ядерная ДНК, популяционно-генетическая изменчивость, Украинские Карпаты.

V.O. Kramarets, R.T. Gout, A. Dzialuk

**POPULATION AND GENETIC DIVERSITY
OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.)
H. KARST.) IN THE UKRAINIAN
CARPATHIANS BASED ON THE ANALYSIS
OF NUCLEAR DNA**

The results of the study genetic structure and diversity of Norway spruce for 7 habitats in the Ukrainian Carpathians by microsatellites of nuclear DNA. The degree of genetic differentiation in allele frequency is increased, with increasing geographical distance between populations but this difference is not statistically significant. Genetic diversity between populations accounts for only 2%, and within populations it is 98%. All the examined populations originate from the same historical refugium and relate to the same metapopulation.

Key words: Norway spruce, nuclear DNA, population and genetic diversity, Ukrainian Carpathians.