

И.И. КОРШИКОВ, А.Е. ДЕМКОВИЧ

Донецкий ботанический сад НАН Украины  
E-mail: donetsk-sad@mail.ru

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПО ЛОКУСАМ GOT И GDH СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ЗОНЕ ДЕЙСТВИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЫБРОСОВ ХИМКОМБИНАТА



По четырем локусам GOT и GDH на протяжении четырех лет изучена изменчивость семенного потомства (зародыши) трех субпопуляций *Pinus sylvestris* L., в разной степени подверженных воздействию выбросов крупного химкомбината по производству азотных удобрений. У потомства растений деградирующей и дигрессирующей субпопуляции в зоне острого воздействия аэрополлютантов (0,3–2 км) отмечена тенденция снижения гетерозиготности и повышенная встречаемость случаев существенного отклонения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого.

© И.И. КОРШИКОВ, А.Е. ДЕМКОВИЧ, 2011

**Введение.** Выбросы промышленных производств, повреждая древесные растения и вызывая снижение жизненного потенциала, часто оказывают негативное воздействие и на их репродуктивную функцию. Так, например, у растений возле крупных промышленных предприятий с большим объемом токсичных выбросов обычно отмечают снижение жизнеспособности пыльцы и семенной продуктивности, а также ухудшение качества семян [1, 2]. Однако имеются и обратные примеры. Так, например, поврежденные аэрополлютантами деревья ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) в одном из районов Германии были более урожайными, и семян в их шишках было больше, чем у категории относительно здоровых деревьев [3]. Такой эффект отмечен нами у поврежденных деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), находящихся в 0,3 км от промплощадки Северодонецкого производственного объединения «Азот» (СПОА). У этих растений количество полнозернистых семян в одной шишке в разные годы наблюдений в среднем было на 5,3–22,6 % выше, чем у растений фоновой зоны загрязнения (15 км) [4]. И это несмотря на то, что в зоне высокого загрязнения выбросами СПОА (0,3–2 км) у растений происходит отмирание части кроны (суховершинность) и преждевременная гибель отдельных поврежденных деревьев. Это отражается на генетической структуре деградирующего древостоя *P. sylvestris* [5]. Можно предположить, что негативное влияние выбросов СПОА на древостой *P. sylvestris* должно в конечном счете сказываться на генетическом разнообразии и структуре их семенного потомства.

В выбросах СПОА доминирующими ингрессиентами являются окислы азота и аммиак, которые, попадая в надземные органы растений, как известно, могут успешно детоксицироваться и включаться в клеточный метаболизм [6]. Известно, что активность ферментов в клетках вегетативных органов у гомо- и гетерозиготных особей заметно отличается, а это должно влиять на интенсивность метаболических превращений азотсодержащих газов техногенного происхождения. В связи с этим представляют интерес исследования изменчивости растений и их семенного потомства (зародыши) в разных

зонах загрязнения выбросами СПОА по локусам, контролирующим ферменты азотного обмена. Вместе с тем важно выяснить, как деградация и дигрессия древостоев *P. sylvestris*, вызванная повреждением растений эмиссиями химкомбината, отражается на системе скрещивания.

**Материалы и методы.** Объектами исследований служили в промзоне Рубежное – Северодонецк три небольшие субпопуляции 80–100-летних растений *P. sylvestris*, равноудаленные от промплощадки Северодонецкого производственного объединения «Азот». Субпопуляции *A* (0,3 км) и *B* (2 км) находятся в зоне высокого, а *Г* (15 км) – фонового загрязнения выбросами химкомбината. Субпопуля-

ция *A* деградировала из-за сильного повреждения деревьев (преждевременная гибель, суховершинность, низкая охвоенность кроны) выбросами химкомбината; в субпопуляции *B* деревья заметно меньше повреждены, и их гибель встречается крайне редко; растения субпопуляции *Г* не имеют явных признаков повреждения за исключением некоторого снижения продолжительности жизни хвои. Сборы шишек (не менее 5 шт. с одного растения) проводили в годы, когда химкомбинат работал на полную мощность и имел максимальный объем выбросов (1989–1990 гг.), и в годы, когда многие цеха не функционировали или работали с перерывами, а значит, снижались объемы выбросов (1996 и 2007 гг.).

Таблица 1  
Значения основных показателей генетического полиморфизма по четырем локусам *GOT* и *GDH* у семенного потомства (зародыши) трех субпопуляций *Pinus sylvestris* L., в разной степени подверженных воздействию выбросов химкомбината по производству азотных удобрений

Год	Выборка	Количество зародышей	Доля полиморфных локусов, P <sub>99</sub>	Количество на локус		Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта, F
				генотипов, P <sub>g</sub>	аллелей, A	наблюдаемая, H <sub>O</sub>	ожидаемая, H <sub>E</sub>	
1989	<i>A</i>	149	0,75	2,50	1,75	0,295 ± 0,100	0,340 ± 0,114	0,128
	<i>B</i>	89	1,00	3,25	2,00	0,291 ± 0,084	0,330 ± 0,087	0,182
	<i>Г</i>	89	0,75	2,50	1,75	0,317 ± 0,106	0,363 ± 0,121	0,126
1990	<i>A</i>	157	1,00	2,75	2,00	0,295 ± 0,095	0,350 ± 0,113	0,119
	<i>B</i>	126	1,00	3,50	2,25	0,277 ± 0,091	0,317 ± 0,091	0,227
	<i>Г</i>	68	0,75	2,50	1,75	0,331 ± 0,118	0,369 ± 0,123	0,100
1996	<i>A</i>	400	1,00	3,00	2,25	0,316 ± 0,098	0,339 ± 0,097	0,055
	<i>B</i>	295	1,00	3,25	2,50	0,319 ± 0,072	0,320 ± 0,079	–0,019
	<i>Г</i>	266	1,00	3,00	2,00	0,353 ± 0,104	0,375 ± 0,107	0,098
2007	<i>A</i>	157	1,00	3,00	2,00	0,318 ± 0,095	0,368 ± 0,108	0,167
	<i>B</i>	85	0,75	3,50	2,25	0,303 ± 0,107	0,378 ± 0,126	0,192
	<i>Г</i>	34	0,75	3,75	2,50	0,353 ± 0,122	0,336 ± 0,116	–0,058
Средние								
1989–2007 ( <i>A</i> )		863	0,94	2,81	2,00	0,306 ± 0,044	0,349 ± 0,048	0,116
1989–2007 ( <i>B</i> )		638	0,94	3,44	2,38	0,298 ± 0,040	0,336 ± 0,044	0,143
1989–2007 ( <i>Г</i> )		450	0,81	2,94	2,00	0,339 ± 0,051	0,361 ± 0,052	0,069
1989 ( <i>A, B, Г</i> )		363	0,83	2,75	1,83	0,301 ± 0,051	0,344 ± 0,057	0,149
1990 ( <i>A, B, Г</i> )		351	0,92	2,92	2,00	0,301 ± 0,054	0,345 ± 0,058	0,153
1996 ( <i>A, B, Г</i> )		961	1,00	3,08	2,25	0,329 ± 0,049	0,344 ± 0,050	0,045
2007 ( <i>A, B, Г</i> )		276	0,83	3,42	2,25	0,325 ± 0,057	0,361 ± 0,061	0,107
1989–2007 ( <i>A, B, Г</i> )		1951	0,90	3,04	2,08	0,314 ± 0,026	0,349 ± 0,027	0,111

Генетическую изменчивость четырех локусов, кодирующих синтез ключевых ферментов азотного обмена – глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT, К.Ф. 2.6.1.1) и глутаматдегидрогеназы (GDH, К.Ф. 1.4.1.2) изучали у зародышей семян промаркированных деревьев, генотип которых также определяли по этим локусам. В разные годы исследований были задействованы, как правило, семена одних и тех же растений, хотя их количество было разным (табл. 1). В большинстве случаев у каждого дерева изучали не менее семи семян. Электрофорез проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля, придерживаясь ранее описанных методик [2, 7].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Наши четырехлетние исследования свидетельствуют о том, что выбросы крупного химического комбината по производству азотных удобрений, существенно повреждая растения двух субпопуляций *P. sylvestris* (А, Б), не вызывают явного снижения их репродуктивного потенциала. Это в первую очередь подтверждается отсутствием существенных отличий в

средней фактической продуктивности полных семян в расчете на одну шишку у растений зон высокого и фонового загрязнений.

Анализ аллозимной изменчивости по четырем локусам GOT и GDH показал, что средняя наблюдаемая гетерозиготность ( $H_O$ ) растений *P. sylvestris* в зоне острых повреждающих воздействий выбросов СПОА (0,3–2 км) составляла 0,393–0,400, что меньше, чем у деревьев зоны фонового загрязнения – 0,512 (табл. 1). Гетерозиготность по этим локусам зародышей семян во все годы наблюдений трех субпопуляций была меньше, чем у материнских растений. При этом наибольшее снижение наблюдаемой гетерозиготности зародышей относительно материнских растений (на 31,1–38,1 %) выявлено у наиболее удаленной и наименее поврежденной аэрополлютантами субпопуляции Г. В зоне острых воздействий выбросов химкомбината гетерозиготность зародышей была меньше, чем у материнских растений в субпопуляции А на 20,5–26,2 % и в субпопуляции Б – на 18,8–29,5 %. Однако во все годы наблюдений гетерозиготность зародышей субпопуляции Г была выше (0,317–0,353), чем в субпопуляциях А (0,295–0,318) и

Таблица 2  
Результаты точного теста отклонений от равновесия Харди-Вайнберга по локусам GOT и GDH у семенного потомства трех субпопуляций *Pinus sylvestris* L. в условиях различной интенсивности воздействия выбросов химкомбината по производству азотных удобрений

Год	Выборка	Got-1	Got-2	Got-3	Gdh	В целом
1989	А	<i>m</i>	0,009 **	0,007 **	0,717	0,004 **
	Б	0,000 ***	0,423	0,152	0,058	0,000 ***
	Г	<i>m</i>	0,079	0,268	0,185	0,019 **
1990	А	1,000	0,283	0,006 **	0,006 **	0,004 **
	Б	0,004 **	0,030 *	0,033 *	0,485	0,001 **
	Г	<i>m</i>	0,003 *	0,640	0,671	0,076
1996	А	1,000	0,821	0,000 ***	0,350	0,021 *
	Б	<b>0,000</b> ***	0,862	0,639	0,147	0,746
	Г	0,014 *	0,249	0,035 *	0,532	0,002 **
2007	А	0,066	0,047 *	0,054	0,067	0,000 ***
	Б	<i>m</i>	0,052	0,000 ***	0,589	0,001 *
	Г	<i>m</i>	0,081	0,902	0,792	0,308
В целом для локуса		–	0,009 **	0,007 **	0,717	0,000 ***

Примечание. Отклонения в сторону дефицита гетерозигот достоверны при: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; жирным шрифтом – эксцесс гетерозигот, обычным – дефицит гетерозигот; *m* – локус мономорфен.

Б (0,277–0,319). Надо отметить и другое: для растений трех субпопуляций свойствен некоторый избыток гетерозигот, максимальный в 31,6 % для субпопуляции Г и значительно меньший для А (11,4 %) и Б (9,5 %), а у зародышей он отмечен только в двух случаях (1,9–5,8 %) из 12 возможных. В остальных случаях для зародышей свойствен недостаток гетерозигот (5,5–22,7 %), что является типичным для природных популяций видов семейства *Pinaceae* Lindl., не подверженных значительным воздействиям аэрополлютантов [7, 8].

Влияние выбросов химкомбината на генетическую изменчивость семенного потомства *P. sylvestris* прослеживается в тенденции повышения гетерозиготности зародышей как по отдельным локусам, так и по их совокупности в годы сокращенных объемов выбросов химкомбината (1996 и 2007 гг.). Так, например, в урожаях семян в эти годы гетерозиготность зародышей в субпопуляциях А и Б была соответственно на 7,8–19,7 и 4,1–15,2 % выше, чем в урожаях семян, когда химкомбинат работал с максимальной загрузкой (1989–1990 гг.). В последние два года наблюдений, когда явно уменьшилось негативное влияние эмиссий химкомбината на растения, что проявилось в увеличении продолжительности жизни хвои и меньшей ее повреждаемости, гетерозиготность зародышей в среднем в трех древостоях повысилась на 8,0–9,3 %, а также возросло аллельное разнообразие на 12,5–23,0 %. Последнее может быть связано с сокращением гибели отцовских гамет, несущих редкие аллели.

В выборках зародышей семян урожаях разных лет выявлено в каждом из трех древостоев достоверное отклонение фактического распределения генотипов по совокупности четырех локусов *GOT* и *GDH* от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга в девяти из 12 возможных вариантов (табл. 2). Два из трех случаев нормального распределения генотипов у зародышей по исследуемым локусам приходилось на субпопуляцию фоновой зоны загрязнения. При попарном анализе неравновесное распределение генотипов выявлено в 17 из

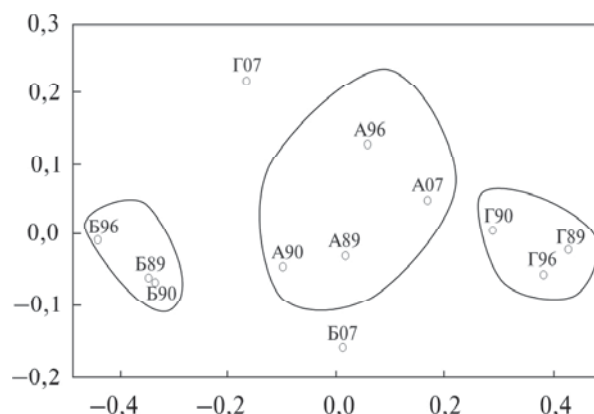
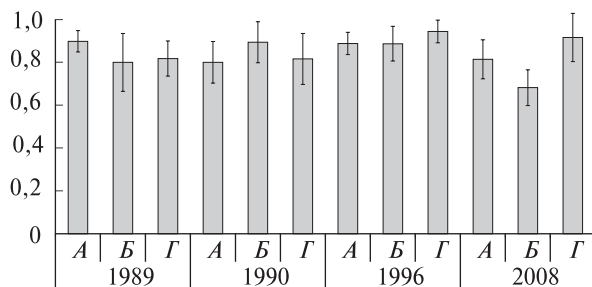


Рис. 1. Ординация выборок из трех субпопуляций *Pinus sylvestris* L., в различной степени подверженных воздействию выбросов химкомбината по производству азотных удобрений, по частотам аллелей четырех локусов *GOT* и *GDH* в пулах отцовских гамет в пространстве первых двух главных компонент: по горизонтали – измерение 1 (81,48 %); по вертикали – измерение 2 (9,62 %)

46 случаев: максимальный вклад вносил локус *Got-3* (7 случаев), минимальный – локус *Gdh* (1 случай). Эти попарные нарушения равновесия в распределении генотипов в выборках зародышей субпопуляции Г встречались в двух случаях за четыре года наблюдений, а в субпопуляциях А и Б соответственно в 7 и 6 случаях. Существенное смещение фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого довольно распространенное явление у зародышей семян популяций разных видов хвойных и связано с эффектами инбридинга [7–9].

Генетическая структура зародышей семян существенно зависит от разнообразия гаплотипов пыльцы, оплодотворяющей яйцеклетки. Ординация методом главных компонент частот аллелей локусов *GOT* и *GDH* в пуле отцовских гамет зародышей семян урожаях разных лет показывает, что, за редким исключением, отцовские гаметы разных древостоев образуют самостоятельные кластеры (рис. 1). Вероятно такое пространственное распределение связано не только со спецификой влияния аэрополлютантов на мужскую генеративную сферу, но и с различиями в генетической структуре растений трех исследуемых субпопуляций.





**Рис. 2.** Мультилокусные оценки системы скрещивания по частотам аллелей четырех локусов GOT и GDH у растений трех субпопуляций *Pinus sylvestris* L., в различной степени подверженных воздействию выбросов химкомбината по производству азотных удобрений: по вертикали –  $t_m$ ; А–Г – выборки

Однако в деградирующей (А) и дигрессирующей (Б) субпопуляциях *P. sylvestris* от повреждающего воздействия выбросов химкомбината не происходит явного снижения доли перекрестного опыления растений в сравнении с сохранившей свою структуру субпопуляцией (Г) фонового уровня загрязнения (рис. 2). Среднее значение мультилокусной оценки степени перекрестного опыления по результатам четырехлетних наблюдений для трех субпопуляций было таким: А = 0,849 ± 0,025, Б = 0,815 ± 0,049, Г = 0,873 ± 0,033. Это несколько ниже, чем в неповрежденных какими-либо экстремальными воздействиями популяциях хвойных, где самоопыление обычно не превышает 10 % [10].

Высокой долей перекрестного опыления можно объяснить факт хорошей завязываемости семян, а также высокий выход полнозернистых семян и низкую пустосемянность в шишках растений всех трех субпопуляций [4]. Пустые семена у *P. sylvestris* обычно в избытке образуются в результате самоопыления растений [11].

Таким образом, хронические повреждения растений популяций *P. sylvestris* токсичными азотсодержащими выбросами химкомбината не приводят к каким-то явно очевидным изменениям в генетической структуре их семенного потомства по локусам GOT и GDH. По показателям генетической изменчивости семенное потомство популяции *P. sylvestris*,

деградирующей от повреждающих воздействий выбросов химкомбината по производству азотных удобрений, мало отличается от потомства популяции фоновой зоны загрязнения. Прослеживаются лишь тенденции, которые проявляются в несколько пониженной гетерозиготности по локусам GOT и GDH у зародышей семян растений зоны высокого загрязнения, а также повышению гетерозиготности потомства всех трех субпопуляций в годы, когда резко сокращались объемы выбросов. Очевидно, что у *P. sylvestris* с широкой видовой амплитудой адаптивных возможностей и в условиях аэротехногенного стресса срабатывают эволюционно выработанные системы надежности половой репродукции, в целом обеспечивающие воспроизводство генетической структуры популяций.

I.I. Korshikov, A.E. Demkovich

#### GENETIC POLYMORPHISM FOR GOT AND GDH LOCI OF SCOTCH PINE SEED EMBRYOS IN THE AREA OF NITROGEN EMISSIONS FROM THE CHEMICAL ENTERPRISE

Variability for the loci GOT and GDH of seed embryos of three subpopulations of *Pinus sylvestris* L. exposed to the emissions from the chemical enterprise manufacturing nitrogen fertilizers was studied during four years. The trend to heterozygosity reduction and increased occurrence of the cases of significant deviation of the distribution of genotypes from the theoretically expected one was shown.

I.I. Коршиков, А.Е. Демкович

#### ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЗА ЛОКУСАМИ GOT ТА GDH НАСІННЕВОГО ПОТОМСТВА СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ В ЗОНІ ДІЇ АЗОТОВМІСНИХ ВИКИДІВ ХІМКОМБІНАТУ

За чотирма локусами GOT та GDH впродовж чотирьох років була вивчена мінливість насінневого потомства (зародки) трьох субпопуляцій *Pinus sylvestris* L., що різною мірою зазнають впливу викидів великого хімічного підприємства з виробництва азотних добрив. У потомстві рослин деградуючої та дигрессируючої субпопуляції в зоні гострої дії аерополітантів (0,3–2 км) відзначено тенденції щодо зниження гетерозиготності та збільшення в них випадків значного відхилення фактичного розподілу генотипів від теоретично очікуваного.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бессонова В.П. Состояние пыльцы как показатель загрязнения среды тяжелыми металлами // Экология. – 1992. – № 4. – С. 45–50.
2. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской). – Донецк : ООО «Лебедь», 2002. – 328 с.
3. Stutz H.E., Frehner E., Burkart A. Nedelverlust der Fichte und Samenguabitat // Forstwiss Cbl. – 1987. – **106**, № 2. – P. 68–77.
4. Коршиков И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – Киев : Наук. думка, 1996. – 238 с.
5. Korshikov I.I., Velikoridko T.I., Butylskaya L.A. Genetic structure and variation in *Pinus sylvestris* L. populations degrading due to pollution-induced injury // *Silvae Genet.* – 2002. – **51**, № 2/3. – P. 45–49.
6. Мальхотра С.С., Хан А.А. Биохимическое и физиологическое действие приоритетных загрязняющих веществ // Загрязнение воздуха и жизнь растений / Под ред. М. Трешоу. – Л.: Гидрометеоиздат, 1988. – С. 144–189.
7. Коршиков И.И., Мудрик Е.А. Сравнительный анализ генетической гетерогенности семенного потомства в изолированной популяции *Pinus sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. в Донбассе // Цитология и генетика. – 2006. – **40**, № 3. – С. 17–23.
8. Korshikov I.I., Pirko N.N., Mudrik E.A. et al. Maintenance of genetic structure in progenies of marginal mountainous and steppe populations of three species of Pinaceae Lindl. family in Ukraine // *Silvae Genet.* – 2007. – **56**, № 1. – P. 1–10.
9. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. *Pinaceae*) Северной Евразии : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2007. – 47 с.
10. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
11. Коски В. Пустые семена – часть выраженного генетического груза // Половая репродукция хвойных : Материалы I Всесоюз. симпоз. – Новосибирск : Наука, 1973. – Ч. 2. – С. 23–30.

Поступила 02.11.10