І.І. КОРШИКОВ[1], А.М. ЛІСНІЧУК[2],
Т.І. ВЕЛИКОРИДЬКО[1], Л.О. КАЛАФАТ[1]

[1] Донецький ботанічний сад НАН України
пр. Ілліча, 110, м. Донецьк, 83059, Україна
herb@herb.dn.ua
[2] Кременецький ботанічний сад
вул. Ботанічна, 5, м. Кременець, Тернопільська обл., 47003, Україна

АЛОЗИМНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ДЕРЕВ З РІЗНОЮ ФОРМОЮ ШИШКИ ПОПУЛЯЦІЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. КРЕМЕНЕЦЬКОГО ГОРБОГІР'Я ТА МАЛОГО ПОЛІССЯ

Ключові слова: Pinus sylvestris *L., популяції, феномаркери, форма шишки, алозимна мінливість*

Рослини одного віку в популяціях деревних видів досить часто мають морфологічні відмінності як окремих органів, так і цілої рослини. Тому актуальним є пошук дискретних феномаркерів, придатних для з'ясування популяційної структури та феногеографічної мінливості видів. Так, наприклад, у хвойних для цього використовують одну з визнаних ознак — форму шишки. Як показали наші попередні дослідження [7], цей фен відзначається надто низькою флуктуаційною мінливістю в різні роки, попри на значні зміни лінійних розмірів шишок. Тому його цілком коректно рекомендують для феногеографічних досліджень популяційної структури *Pinus sylvestris* L. [3].

Використовуючи феномаркери для оцінки популяційної структури виду, важливо не лише виділити дискретні варіації фенів, а й з'ясувати характер їх успадковування. Для тварин і рослин знайдено десятки чи навіть сотні фенів, однак лише для деяких виконано оцінку їх генетичної зумовленості. С.А. Петров [10] вважає, що генетичну детермінованість ознаки або її розрахованого індексу можна встановити у дерев без вивчення їх спадкування в наступних поколіннях. Коли ознака стабільна в кроні дерева, в різні роки вегетації, незалежно від зміни еколого-кліматичних умов, то вона генетично зумовлена. Генетично детерміновані морфологічні ознаки нерідко мають нейтральний характер, тобто не піддаються добору [6]. Визначити генетичну зумовленість морфологічних ознак дають змогу пошук та аналіз зв'язків між ними та алозимною мінливістю в популяціях тварин і рослин [1]. Незважаючи на те, що форму шишки у видів хвойних давно використовують для визначення їх популяційної і феногеографічної мінливості [2, 9], генетичну детермінованість цього фену за даними алозимної мінливості не вивчали.

Мета роботи — аналіз відмінностей за рівнем алозимного поліморфізму у груп дерев з різною формою шишки в популяціях *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я та Малого Полісся.

© І.І. КОРШИКОВ, А.М. ЛІСНІЧУК, Т.І. ВЕЛИКОРИДЬКО, Л.О. КАЛАФАТ, 2009

Матеріали і методи досліджень

Нормальні непошкоджені шишки відстрілювали взимку з дерев заввишки до 30 м десь 140-річного віку в трьох популяціях *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я та Малого Полісся: Суразька дача, урочища (далі ур.) Заріччя та Бір. Кількість дерев, задіяних у досліджуваних популяціях, варіювала від 30 до 67. З кожного дерева збирали не менше п'яти шишок та вимірювали їх довжину (L) і діаметр (D) за допомогою штангенциркуля. Форму кожної шишки визначали, використовуючи традиційний індекс — відношення D/L, і, згідно з класифікацією С.А. Мамаєва [9], виділяли: вузькоконусоподібні (D/L = ≤ 0,45), конусоподібні (D/L = 0,46—0,54) та ширококонусоподібні (D/L = ≥ 0,55) шишки (рис. 1). З досліджених 149 дерев трьох популяцій виокремлено три групи за параметрами індексу форми шишки.

Генетичний поліморфізм *P. sylvestris* вивчали, використовуючи як молекулярно-генетичні маркери ізоферменти дев'яти ферментних систем, а саме — алкогольдегідрогенази (ADH), глутаматоксалоацетаттрансамінази (GOT), діафорази (DIA), глутаматдегідрогенази (GDH), малатдегідрогенази (MDH), кислої фосфатази (ACP), лейцинамінопептидази (LAP), супероксиддисмутази (SOD), форміатдегідрогенази (FDH). В електрофоретичному аналізі ферментів, який проводився у 7,5 %-му поліакриламідному гелі, використовували мегагаметофіти 7—8 насінин з кожного дерева. Методика екстракції ферментів, їх електрофоретичного розділення, гістохімічного забарвлення ізоферментів на гелевих пластинах, номенклатура локусів та алелів детально викладена у нашій попе-

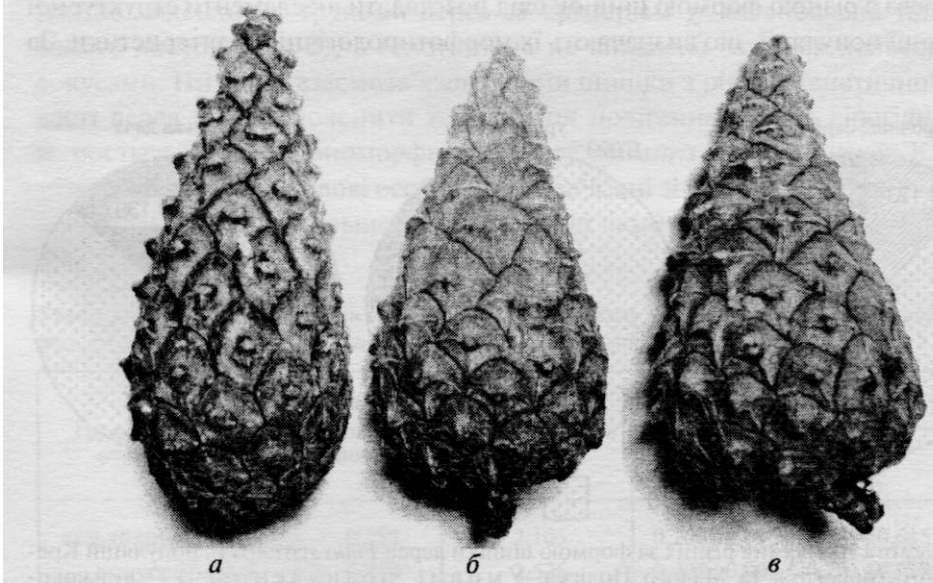

Рис. 1. Форма шишки у популяціях *Pinus sylvestris* L. Кременецького горбогір'я та Малого Полісся: *а* — вузькоконусоподібні, *б* — конусоподібні, *в* — ширококонусоподібні

Fig. 1. Cone shape in *Pinus sylvestris* L. populations of Kremenetsre Horbohiriya and Male Polissia: *а* — with narrow cone-like shape; *б* — with cone-like shape; *в* — with wide cone-like shape

редній праці, присвяченій дослідженням популяційно-генетичної мінливості *P. sylvestris* [8].

За допомогою електрофорезу визначено алелі 19 алозимних локусів, які використовували для розрахунку показників генетичного поліморфізму та генетичної дистанції за М. Неєм [11] у груп дерев з різною формою шишки. Гетерогенність частот алелів та генотипів у трьох групах оцінювали за стандартним χ^2-тестом [5].

Результати досліджень та їх обговорення

Індекс форми шишки (ІФШ) — досить стабільний фен у межах крони дерева, коефіцієнт його ендогенної мінливості становить близько 2—4 %. В усіх досліджуваних популяціях *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я та Малого Полісся є дерева з вузькоконусоподібними, конусоподібними та ширококонусоподібними шишками (рис. 2). Найбільшою є частка дерев з конусоподібними шишками — 58,6—72,1 %, що характерне для багатьох популяцій *P. sylvestris* з центральної частини її природного ареалу [2]. Значно менше представлені дерева з вузькоконусоподібними — 13,8—25,0 % та ширококонусоподібними — 2,9—27,6 % шишками. Загалом у трьох популяціях виявлено 103 (69,1 %) дерева з конусоподібними, з вузькоконусоподібними — 29 (19,5 %), з ширококонусоподібними шишками — 17 (11,4 %). У межах природного ареалу в популяціях *P. sylvestris* на півночі Росії переважають дерева з конусоподібними шишками, хоча трапляються окремі популяції, де більшість дерев або значна їх кількість (40—50 %) мають вузькоконусоподібні шишки [2].

Дерева з різною формою шишок слід розглядати як елементи структурної організації популяції, що визначають їх морфотипологічні характеристики. За

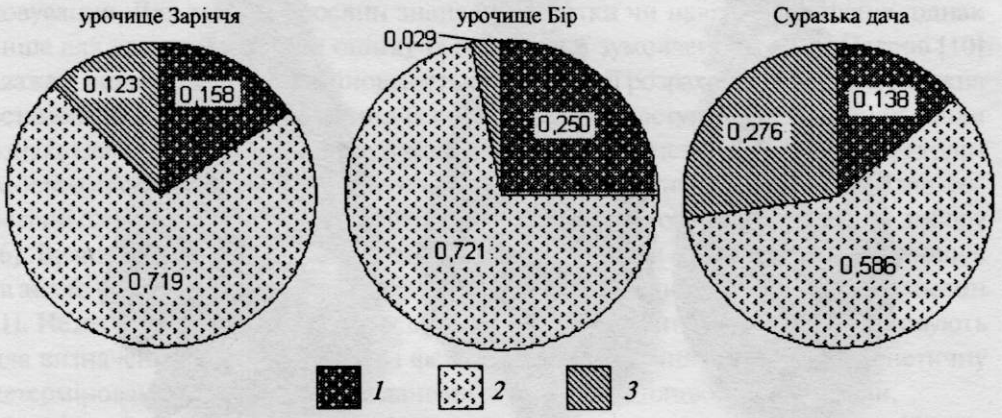

Рис. 2. Частота трапляння різних за формою шишки дерев *Pinus sylvestris* L. популяцій Кременецького горбогір'я та Малого Полісся. Умовні позначення: 1 — вузькоконусоподібні; 2 — конусоподібні; 3 — ширококонусоподібні

Fig. 2. Freguency of occurrence of the different by their cone shape *Pinus sylvestris* L. trees in populations of Kremenetske Horbohiriya and Male Polissia: Symbols indicate: 1 — with narrow cone-like shape; 2 — with cone-like shape; 3 — ширококонусоподібні

критерієм подібності (r) Л.А. Животовського [4] встановлено ступінь їх схожості за частотами трьох груп дерев. Досліджувані популяції мали низький рівень відмінностей: ур. Заріччя — ур. Бір — 0,978, ур. Заріччя — Суразька дача — 0,981, ур. Бір — Суразька дача — 0,925 за присутністю дерев з різною формою шишки.

Генетична структура груп дерев з різною формою шишки була близькою, що підтвердили значення коефіцієнта генетичної дистанції (D_N) M. Nei [11], розраховані між ними на основі частот алелів 19 локусів. Значення D_N були дуже низькими і змінювалися від 0,002 до 0,007. Зауважимо, що диференціація цих трьох популяцій за частотами алелів тих же 19 локусів була ще меншою: D_N = 0,001—0,005. Згідно з показником подібності Л.А. Животовського [4] вибірки дерев з різною формою шишки за частотами алелів 19 локусів дуже мало відрізнялись: ур. Заріччя — ур. Бір — 0,995; ур. Заріччя — Суразька дача — 0,989; ур. Бір — Суразька дача — 0,988.

Кількісний аналіз генетичної мінливості у груп дерев за феноознакою — формою шишки — засвідчує, що, за винятком рослин з ширококонусоподібними шишками, частка поліморфних локусів у виділених групах була такою, як і середньопопуляційна (таблиця). Найменша середня кількість алелів на локус виявлена у групі рослин з ширококонусоподібними шишками, але це може бути пов'язано з найменшою чисельністю цієї групи. Всі три групи дерев мали близький рівень наявної та очікуваної гетерозиготності, який до того ж мало відрізнявся від середньопопуляційного.

На відсутність унікальної генетичної структури у груп дерев з різною формою шишки вказує той факт, що достовірна алельна гетерогенність між трьома виділеними групами дерев за критерієм χ^2 встановлена тільки для одного локусу (Adh-2), а генотипічна не виявлена за всіма поліморфними локусами. Низький взаємозв'язок форми шишки з рівнем генетичної мінливості дерев можна пояснити тим, що ця полігенна ознака вірогідно контролюється групою мономорфних генів *P. sylvestris*. Як припускає Ю.П. Алтухов [1], унікальні видові особливості пов'язані зі стабільними мономорфними генами, котрі найбільше функціонально навантажені.

Значення основних показників генетичного поліморфізму у групах дерев з різною формою шишки популяцій *Pinus sylvestris* L. Кременецького горбогір'я та Малого Полісся

Групи дерев з різною формою шишки	Частка поліморфних локусів P_{99}	Середня кількість алелів на локус, A	Середня гетерозиготність		Індекс фіксації Райта F
			очікувана H_E	наявна H_O	
вузькоконусоподібні	0,789	2,105	0,201±0,015	0,189±0,015	0,060
конусоподібні	0,789	2,526	0,205±0,008	0,201±0,008	0,020
ширококонусоподібні	0,684	1,789	0,193±0,020	0,201±0,020	-0,041
середні значення для трьох вибірок	0,789	2,579	0,205±0,007	0,197±0,007	0,039

Ідентифікація генів, які контролюють розвиток кількісних ознак, що мають назву їх головних генів — Quantitive Trait Loci (QTL), — а також пошук молекулярно-генетичних маркерів, щільно зчеплених з ними, потребують вивчення всього геному рослин та картування генів кількісних ознак. Це доволі складне завдання, виконання якого в Україні перебуває на початковій стадії навіть для цінних сільськогосподарських рослин, а до того ж воно високовартісне. Для диких видів на цьому етапі розвитку науки його простіше вирішувати на популяційному рівні, якщо кількісна ознака не є селективно нейтральною, тобто слабо пов'язана з рівнем генетичної мінливості рослин, як форма шишки у *P. sylvestris*. Таким чином, індивідуальна гетерозиготність дерев *P. sylvestris* з різною формою шишки в популяціях Кременецького горбогір'я і Малого Полісся розподіляється випадково. Це підтверджує відсутність суттєвих відмінностей у середній гетерозиготності трьох груп дерев — з вузькоконусоподібною, конусоподібною та ширококонусоподібною формами шишки. А це, своєю чергою, засвідчує, що форма шишки у *P. sylvestris* не є адаптивно значущою ознакою.

1. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. — 3-е изд. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. — 431 с.
2. *Видякин А.И.* Изменчивость формы шишек в популяциях сосны обыкновенной на востоке европейской части СССР // Лесоведение. — 1991. — № 3. — С. 45—52.
3. *Видякин А.И.* Фены лесных древесных растений: выделение, масштабирование и использование в популяционных исследованиях (на примере *Pinus sylvestris* L.) // Экология. — 2001. — № 3. — С. 197—202.
4. *Животовский Л.А.* Показатель сходства популяций по полиморфным признакам // Журн. общ. биол. — 1979. — **40**, № 4. — С. 587—602.
5. *Животовский Л.А.* Популяционная биометрия. — М.: Наука, 1991. — 271 с.
6. *Ирошников А.И., Мамаев С.А., Некрасов В.И.* Генетический фонд лесных древесных пород СССР // Лесная генетика, селекция и физиология древесных растений: Мат-лы Междунар. симп. (Воронеж, 25—30 сентября 1989 г.). — М., 1989. — С. 9—16.
7. *Коршиков И.И.* Адаптация растений к условиям техногенно загрязнённой среды. — Киев: Наук. думка, 1996. — 238 с.
8. *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.
9. *Мамаев С.А.* Формы внутривидовой изменчивости древесных растений (на примере *Pinaceae* на Урале). — М.: Наука, 1973. — 284 с.
10. *Петров С.А.* О генотипической обусловленности фенов в популяциях лесных древесных растений // Фенетика природных популяций: Мат-лы IV Всесоюз. совещ. (Борок, ноябрь 1990 г.). — М.: Ин-т биол. развит. им. Н.К. Кольцова АН СССР, 1990. — С. 214—215.
11. *Nei M.* Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. — 1972. — **106**. — P. 283—292.

Рекомендує до друку
Є.Л. Кордюм

Надійшла 18.09.2008

И.И. Коршиков[1], А.Н. Лисничук[2], Т.И. Великоридько[1], Л.А. Калафат[1]

[1] Донецкий ботанический сад НАН Украины
[2] Кременецкий ботанический сад

АЛЛОЗИМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДЕРЕВЬЕВ С РАЗНОЙ ФОРМОЙ ШИШКИ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. КРЕМЕНЕЦКОГО ХОЛМОГОРЬЯ И МАЛОГО ПОЛЕСЬЯ

В трех популяциях *Pinus sylvestris* L. Кременецкого холмогорья и Малого Полесья у ~140-летних деревьев изучена изменчивость фенопризнака — формы шишки. Во всех популяциях преобладают растения с конусовидными (58,6—72,1 %), менее представлены — с узкоконусовидными (13,8—25,0 %) и ширококонусовидными (2,9—27,6 %) шишками. Анализ аллозимной изменчивости по 19 локусам 9 ферментных систем этих трех классов деревьев показал, что они очень слабо отличаются по уровню наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Генетическая дистанция между этими внутрипопуляционными классами деревьев была также очень низкой (D_N = 0,002—0,007).

Ключевые слова: Pinus sylvestris *L., популяции, феномаркеры, форма шишки, аллозимная изменчивость.*

I.I. Korshikov[1], A.N. Lisnichuk[2], T.I. Velikoridko[1], L.A. Kalafat[1]

[1] Donetsk Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Ukraine
[2] Kremenets Botanical Gardens

ALLOZYME POLYMORPHISM OF *PINUS SYLVESTRIS* L. TREES WITH VARIOUS CONE SHAPES IN THE POPULATIONS OF KREMENETS HILLS AND LESSER POLISSYA

Variation of a phenotypic character, the cone shape, was studied in 140-year-old trees growing in three relic populations of Kremenets Hills (Kremenetske Horbohiriya) and Lesser Polissya (Male Polissia), Western Ukraine. In all populations the plants with conical shape prevail (58.6—72.1 %), whereas plants with the narrowly conical shape (13.8—25.0 %) and widely conical shape (2.9—27.6 %) are less representative. An analysis of the allozyme variation at 19 loci of 9 enzyme systems in these three classes of trees showed that they differ insignificantly in their levels of the observed and expected heterozygosity. The genetic distance between the named classes of trees within population was also very low (D_N = 0.002—0.007).

Key words: Pinus sylvestris *L., populations, phenologic markers, cone shape, allozyme variation.*