



УДК 581.15:634.942(477.75)

© 2010

И. И. Коршиков, Д. Ю. Подгорный, Л. А. Калафат,
Т. И. Великоридько

Популяционно-генетическая изменчивость сосны Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch) в Горном Крыму

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Я. П. Дидуком)

За допомогою електрофоретичного аналізу 20 ізоферментних локусів 9 ферментних систем, вивчено рівень генетичної мінливості чотирьох популяцій сосни Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch) у Гірському Крыму. Встановлено популяційний рівень наявної та очікуваної гетерозиготностей: $H_O = 0,177 \div 0,228$, в середньому $0,200$; $H_E = 0,178 \div 0,219$, в середньому $0,210$. Виявлено низьку підрозділеність ($F_{ST} = 0,020$) і диференціацію ($D_N = 0,011$) досліджуваних популяцій.

При разработке научно-практических подходов сохранения биоразнообразия важно выявить генетический полиморфизм и объем генного разнообразия охраняемых видов. Актуальны с этих позиций также исследования популяционно-генетической изменчивости узкоареальных эндемичных видов, потенциальная угроза исчезновения которых возрастает в связи с глобальными климатическими изменениями и усиливающимся антропогенным прессингом. Такие исследования способствуют пониманию природы и значения полиморфизма в генетической устойчивости популяционных систем [1].

В верхнем лесном поясе Крыма локально на ограниченной территории произрастает сосна Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch) [2], основные популяции которой пока еще не подвергались пожарам и необратимым антропогенным воздействиям. Сохранившиеся на заповедных территориях небольшие популяции *P. kochiana* позволяют выявить адаптивную структуру генофонда и оптимум генного разнообразия этого узкоареального таксона. Это достаточно просто выполнить, если в качестве маркеров генотипа использовать изоферменты. С помощью анализа аллозимной изменчивости установлена генетическая структура популяций и определен адаптивный оптимум гетерозиготности для многих десятков видов семейства Pinaceae Lindl., произрастающих на разных континентах нашей планеты. И далеко не всегда малочисленные узкоареальные виды отличались пониженным уровнем генетического полиморфизма [3, 4]. Горные популяции *P. kochiana* — очень интересный

объект для выяснения генетических последствий географической изоляции от близкородственной сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), у которых не должно быть жестких репродуктивных барьеров интрогрессивной гибридизации [5].

Наша цель — анализ популяционно-генетического разнообразия *P. kochiana* в Горном Крыму для выяснения баланса интеграции и дифференциации генофонда этого таксона.

Объектами исследований служили четыре популяции *P. kochiana* Горного Крыма: в урочищах “Красный камень” и “Гурзуфское седло” на южном склоне г. Караул-Кая, на юго-западном склоне от Никитской яйлы и на северном склоне от Бабуган яйлы. Возраст деревьев, с которых были собраны шишки с семенами для последующего анализа аллозимной изменчивости, составлял 80–150 лет, а их выборки насчитывали 29–30 экземпляров.

Для определения генотипа растения в качестве биохимических маркеров использовали изоферменты девяти ферментных систем: алкогольдегидрогеназы (АДН, К. Ф. 1.1.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаминазы (ГОТ, К. Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназы (ГДН, К. Ф. 1.4.1.2), диафоразы (DIA, К. Ф. 1.6.4.3), кислой фосфатазы (АСР, К. Ф. 3.1.3.2), лейцинаминопептидазы (LAP, К. Ф. 3.4.11.1), малатдегидрогеназы (МДН, К. Ф. 1.1.1.37), супероксиддисмутазы (SOD, К. Ф. 1.15.1.1) и формиатдегидрогеназы (FDH, К. Ф. 1.2.1.2). Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из восьми и более эндоспермов семян каждого растения, проводили в вертикальных пластинках 7,5%-го полиакриламидного геля с рН 8,9 разделяющего геля в трис-глициновом электродном буфере, рН 8,3 [6]. Предварительно был установлен генетический контроль исследуемых изоферментов [7]. Для оценки уровня изменчивости определяли частоты аллелей и генотипов изучаемых 20 локусов. Подразделенность популяций выясняли, используя показатели *F*-статистик Райта и *G*-статистики Нея, а дифференциацию устанавливали с помощью генетической дистанции Нея [8]. Аллельную и генотипическую гетерогенность популяций оценивали по стандартному χ^2 -тесту [9]. В статистической обработке генетических данных использовали пакет компьютерных программ BIOSYS-1 [10].

Стабильное электрофоретическое разделение отдельных изоферментов девяти ферментных систем мегагаметофитов семян *P. kochiana* позволило качественно интерпретировать 20 генных локусов, из которых только Sod-1, Sod-2, Sod-3, Sod-4 были мономорфными (табл. 1). Из 16 полиморфных локусов наиболее изменчивыми были восемь — Gdh, Got-2, Got-3, Dia-1, Asp, Lap-1, Mdh-3, Mdh-4, средняя гетерозиготность (H_O) по которым варьировала в пределах 26,1–47,1%. Низким уровнем гетерозиготности характеризовались три локуса — Got-1, Dia-2 и Mdh-2, а для остальных пяти локусов установлены средние значения гетерозиготности. Для объединенной выборки в 119 деревьев *P. kochiana* идентифицировано 48 аллелей и 70 генотипов 20 аллозимных локусов. Частоты преобладающего аллеля (1,00) во всех популяциях по всем полиморфным локусам были выше 0,500.

Изучаемые популяции имеют некоторые отличия в генетической структуре, что подтверждает большое число локусов с существенной аллельной (8) и генотипической (6) гетерогенностью. К примеру, при исследовании аллозимной изменчивости по 22 локусам 15 популяций *P. sylvestris* от Луганской до Львовской областей достоверная аллельная гетерогенность установлена по 6 локусам, а генотипическая — по 12 локусам [11]. По подавляющему большинству локусов генетическая структура исследуемых популяций *P. kochiana* уравновешена. Случаи существенного несоответствия фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому согласно закону Харди–Вайнберга установлены для двух-четырёх локусов в этих популяциях (табл. 2). Всего таких случаев было 11 и касались они семи локусов, из которых четыре относились к высокоизменчивым.

Таблица 1. Число аллелей и генотипов, их популяционная гетерогенность, средние полукусные значения гетерозиготности для *Pinus kochiana* Горного Крыма

Фермент	Локус	Количество в общей выборке		Популяционная гетерогенность, χ^2 -тест		Средняя гетерозиготность по виду	
		аллелей	генотипов	аллельная	генотипическая	наблюдаемая	ожидаемая
Алкогольдегидрогеназа	Adh-1	2	3	8,4(3)*	14,7(6)*	0,143	0,168
	Adh-2	4	5	12,0(9)	12,8(12)	0,143	0,145
Глутаматдегидрогеназа	Gdh	2	3	13,7(3)**	29,1(6)***	0,404	0,385
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза	Got-1	2	2	3,0(3)	3,0(3)	0,008	0,008
	Got-2	2	3	2,1(3)	9,4(6)	0,437	0,452
	Got-3	3	4	19,9 (6)**	23,7(9)**	0,412	0,364
Диафораза	Dia-1	3	5	15,6(6)*	17,8(12)	0,462	0,427
	Dia-2	2	2	3,0(3)	3,0(3)	0,008	0,008
	Dia-4	3	5	12,6(6)	25,4(12)*	0,109	0,159
Кислая фосфатаза	Acp	4	5	21,6(9)*	27,7(12)**	0,471	0,379
Лейцинаминопептидаза	Lap-1	4	7	20,2(9)*	24,3(15)	0,353	0,329
	Lap-2	4	5	19,5(9)*	17,8(12)	0,185	0,226
Малатдегидрогеназа	Mdh-2	2	2	7,6(3)	7,8(3)*	0,059	0,056
	Mdh-3	2	5	5,4(6)	15,9(12)	0,437	0,501
	Mdh-4	3	6	13,1(6)*	22,6(15)	0,261	0,332
Формиатдегидрогеназа	Fdh	2	4	1,2(3)	5,5(6)	0,109	0,132
Супероксиддисмутаза	Sod-1	1	1	0	0	0	0
	Sod-2	1	1	0	0	0	0
	Sod-3	1	1	0	0	0	0
	Sod-4	1	1	0	0	0	0

Примечание. В скобках указаны степени свободы. Достоверные отличия при: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

В четырех популяциях *P. kochiana* 65–75% аллозимных локусов были полиморфны (табл. 3). Среднее число аллелей на локус в этих популяциях варьировало от 1,9 до 2,1, а генотипов — 2,3–2,6, составив в целом для таксона соответственно 2,4 и 3,5. Аллельное представительство на локус у *P. kochiana* заметно меньше (на 37,1%), чем в 15 популяциях близкородственной *P. sylvestris* в пределах ее ареала в Украине [11]. Хотя на данном показателе может сказываться разный объем изучаемых выборок растений этих таксонов. Значительно менее зависимые от объема выборок показатели гетерозиготности были меньшие у *P. kochiana*, чем у *P. sylvestris*. Так, у *P. kochiana* наблюдаемая гетерозиготность изменялась в пределах 0,177–0,228, составив в среднем 0,200. В 15 украинских популяциях у *P. sylvestris* этот показатель варьировал в значительно больших пределах: 0,185–0,300, в среднем — 0,232. Та же тенденция наблюдается и в изменении ожидаемой гетерозиготности у сравниваемых таксонов. Средний уровень гетерозиготности *P. kochiana* близок к таковому показателю для реликтовых популяций *P. sylvestris* Украинских Карпат, а также популяций Расточья и Полесья, но заметно ниже, чем у степных и лесостепных популяций главной лесобразующей породы Украины [11]. К тому же, если для популяций *P. sylvestris* в целом свойственен избыток гетерозигот в 2,2%, то для популяций *P. kochiana* — их недостаток в 4,8%, по данным индекса фиксации Райта.

Расчеты коэффициента инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}) еще раз подтверждают, что для *P. kochiana* свойственен недостаток гетерозигот (табл. 4). Согласно средним значениям коэффициентов F_{ST} и $G_{ST} \sim 98\%$ всей генетической изменчивости находится внутри популяций *P. kochiana* и только $\sim 2\%$ приходится на межпопуляционную изменчивость. У 15 украинских популяций *P. sylvestris* на межпопуляционную изменчивость приходится 4% [11]. Исследуемые аллозимные локусы *P. kochiana* вносят разный вклад в подразделенность популяций, наибольший — Got-3, Gdh, Asp, Lap-2, Adh-1 и Mdh-2.

Значения коэффициента генетической дистанции Нея (D_N) [7], с помощью которого определяют дифференциацию популяций, у *P. kochiana* варьировали от 0,004 до 0,018, составив в среднем 0,011. Для 15 популяций *P. sylvestris*, изученных в пределах ареала в Украине, среднее значение D_N равнялось 0,016 [11]. В целом можно констатировать, что генетическая подразделенность и дифференциация популяций *P. kochiana* в Горном Крыму невысокая.

Для фрагментированных популяций древесных растений свойственна высокая генетическая дифференциация и значительный инбридинг [12]. Этого не отмечено нами в по-

Таблица 2. Случаи существенного отклонения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди–Вайнберга в популяциях *Pinus kochiana* Горного Крыма

Локус	Местонахождение популяции			
	Урочище “Красный камень”	Никитская яйла, юго-западный склон	Урочище “Гурзуфское седло”	Бабуган яйла, северный склон
Got-2	3,9(1)*	n. s.	n. s.	n. s.
Gdh	4,1(1)*	n. s.	4,7(1)*	n. s.
Dia-4	n. s.	n. s.	n. s.	36,4(3)***
Mdh-3	n. s.	n. s.	4,8(1)*	n. s.
Mdh-4	8,5(3)*	14,1(3)**	n. s.	8,8(3)*
Adh-1	n. s.	n. s.	n. s.	8,1(1)**
Fdh	6,2(1)*	6,5(1)*	n. s.	n. s.

Примечание. В скобках указаны степени свободы. Достоверные отличия при:

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. n. s. — различия недостоверны.

Таблица 3. Значения основных показателей генетического полиморфизма четырех популяций *Pinus kochiana* Горного Крыма

Местонахождение популяции, высота над уровнем моря	Выборка деревьев, шт.	Доля поли- морфных локусов, P_{99}	Среднее число на локус		Средняя гетерозиготность		Индекс фиксации Райта, F
			аллелей	генотипов	ожидаемая, H_E	наблюдаемая, H_O	
Урочище “Красный камень”, 1250–1350 м н. у. м.	29	0,700	1,900	2,400	$0,209 \pm 0,015$	$0,195 \pm 0,014$	0,067
Никитская яйла, 1350 м н. у. м., юго-западный склон	30	0,700	2,100	2,500	$0,219 \pm 0,015$	$0,228 \pm 0,015$	-0,041
Урочище “Гурзуфское седло”, 1250 м н. у. м.	30	0,650	2,000	2,300	$0,178 \pm 0,014$	$0,177 \pm 0,014$	0,006
Бабуган яйла, 1250–1300 м н. у. м., северный склон	30	0,750	2,100	2,600	$0,209 \pm 0,015$	$0,200 \pm 0,014$	0,043
В целом по виду	119	0,700	2,400	3,500	$0,210 \pm 0,008$	$0,200 \pm 0,007$	0,048

Таблица 4. Значения коэффициента F -статистики Райта и G -статистики Нея для четырех популяций *Pinus kochiana* Горного Крыма

Локус	F_{IS}	F_{ST}	G_{ST}
Got-1	0,001	0,013	0,013
Got-2	0,024	0,009	0,009
Got-3	-0,147	0,051	0,070
Gdh	-0,085	0,038	0,058
Dia-1	-0,082	0,018	0,007
Dia-2	-0,001	0,013	0,013
Dia-4	-0,146	0,029	0,031
Mdh-2	-0,029	0,032	0,032
Mdh-3	0,126	0,010	0,007
Mdh-4	0,195	0,029	0,029
Sod-1	0	0	0
Sod-2	0	0	0
Sod-3	0	0	0
Sod-4	0	0	0
Adh-1	0,066	0,035	0,035
Adh-2	-0,013	0,018	0,023
Acp	-0,212	0,034	0,042
Fdh	0,189	0,005	0,005
Lap-1	-0,083	0,029	0,034
Lap-2	0,125	0,033	0,051
Среднее	0,011	0,020	0,023

пуляциях у мозаично-диффузного ареала *P. kochiana* в Горном Крыму. Гетерозиготность *P. kochiana* находится в рамках варьирования гетерозиготности, установленной для 41 вида рода *Pinus* L., у которых средняя ожидаемая гетерозиготность изменяется в пределах 0,189–0,227 [3]. Существует предположение, что эффективный размер популяции во многом определяется уровнем аллозимной изменчивости [13]. На основании проделанного нами анализа можно утверждать, что исторически сложившийся размер популяций *P. kochiana* — эффективен. В них не нарушено оптимальное соотношение внутри- и межпопуляционной компонент генного разнообразия и пока не происходит непропорциональное выпадение или изъятие одних генотипов и воспроизводство других. Если бы это имело место, то привело бы к резкому повышению случаев неравновесного распределения генотипов в популяциях и возрастанию значений коэффициентов F_{ST} и G_{ST} , характеризующих подразделенность популяций. В целом можно констатировать, что небольшие популяции узколокальной географически изолированной *P. kochiana* характеризуются меньшим уровнем генетической изменчивости, чем близкородственная широкоареальная *P. sylvestris*. Установленный уровень изменчивости *P. kochiana* можно рассматривать как оптимальный для данного таксона, а поэтому популяции этого вида необходимо тщательно охранять, особенно от участвовавших в Крыму пожаров. В случае их возникновения на больших площадях следует ожидать сокращения внутрипопуляционного полиморфизма, что в целом отразится на адаптивном потенциале *P. kochiana*.

1. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. – 3-е изд. – Москва: Академкнига, 2003. – 431 с.
2. Дидух Я. П. Растительный покров горного Крыма (структура, динамика, эволюция и охрана). – Киев: Наук. думка, 1992. – 256 с.
3. Delgado P., Cuenca A., Escalante A. E. et al. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences // Revista Chilena de Historia Natural. – 2002. – No 75. – P. 27–37.

4. Политов Д. В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. *Pinaceae*) северной Евразии: Автореф. дис. . . . д-ра биол. наук. – Москва, 2007. – 47 с.
5. Правдин Л. Ф. Сосна обыкновенная. – Москва: Наука, 1964. – 192 с.
6. Davis B. J. Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – **121**. – P. 404–427.
7. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. – 1972. – **106**. – P. 283–292.
8. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby T. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 4. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics (US). – 1969. – **61**. – P. 841–858.
9. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. – Москва: Наука, 1991. – 271 с.
10. Swofford D. L., Selander R. B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Hered. – 1981. – **72**, No 4. – P. 281–283.
11. 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.
12. Aldrich P. R., Hamrick J. L. et al. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera* // Mol. Ecol. – 1998. – **7**, No 8. – P. 933–944.
13. Avise J. C. Molecular markers, natural history and evolution. – New York: Chapman, 1994. – 511 p.

Донецкий ботанический сад НАН Украины
 Никитский ботанический сад УААН –
 Национальный научный центр, Ялта

Поступило в редакцию 09.09.2009

I. I. Korshikov, D. Yu. Podgornyi, L. A. Kalafat, T. I. Velikorid'ko

Population-and-genetic variation of the *Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch in the Mountain Crimea

Based on electrophoretic analysis of 20 isozymes loci controlling 9 enzyme systems, the level of genetic variation of four populations of the Pinus kochiana Klotzsch ex Koch in the Mountain Crimea is studied. It is determined that the population level of observed and expected heterozygosity has made $H_O = 0.177 \div 0.228$ (0.200 on the average) and $H_E = 0.178 \div 0.219$ (0.210 on the average), respectively. Subdivision ($F_{ST} = 0.020$) and the differentiation ($D_N = 0.011$) in the investigated populations were low.