

КРАВЕЦЬ О. А.<sup>1</sup>✉, ПІРКО Я. В.<sup>1</sup>, КАЛАФАТ Л. О.<sup>1</sup>, РАБОКОНЬ А. М.<sup>1</sup>, БІЛОНОЖКО Ю. О.<sup>1</sup>, ПОСТОВОЙТОВА А. С.<sup>1</sup>, ЛИХОЛАТ Ю. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

<sup>2</sup> Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна, 49000, м. Дніпро, проспект Гагаріна, 72

✉ [kravetshelen@gmail.com](mailto:kravetshelen@gmail.com), (067) 233-57-46

## ЕМБРІОНАЛЬНА ЗАГИБЕЛЬ НАСІННЯ В ІНВАЗИВНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *ULMUS PUMILA* L. ТА *ULMUS SUBEROSA* MOENCH У СТЕПОВОМУ ПРИДНІПРОВ'І

**Мета.** Аналіз ембріональної загибелі та життєздатності насіння як показників генетичного та репродуктивного стану *Ulmus pumila* L. та *Ulmus suberosa* Moench (або *U. campestris* var. *suberosa* Wahl) для з'ясування механізмів інвазивності їхніх популяцій у Степовому Придніпров'ї. **Методи.** Морфологічні, анатомічні, цитологічні, статистичні. **Результати.** Досліджені популяції *U. pumila* відрізнялися за показниками ембріональної загибелі, життєздатності насіння та ступенем гетерозиготності. Популяції, що зростають у більш екологічно сприятливих умовах, характеризувалися кращими репродуктивним, фізіологічним та генетичним станом. Дві з трьох досліджених популяцій *U. pumila* відрізнялися низькими показниками ембріональної загибелі, високими індексами життєздатності насіння та насінневої продуктивності. Це може свідчити про гетерогенне походження цих популяцій та/або значний рівень гетерозиготності. Навпаки, для популяції *U. suberosa* властиві високі показники ембріональної загибелі насіння та низькі індекси життєздатності насіння, що може бути зумовлено обмеженістю популяції та/або її поганим фізіологічним станом та зниженням рівня гетерозиготності. **Висновки.** У степовому Придніпров'ї трапляються різні за рівнем гетерозиготності популяції *U. pumila*. Імовірно, насіннєве відтворення та поширення цього виду суттєво не лімітується ні генетичними, ні фізіологічними, ні екологічними факторами. Популяції *U. suberosa* в цьому регіоні характеризуються гіршими показниками генетичного стану; їхнє насіннєве відтворення може суттєво лімітуватися.

**Ключові слова:** ембріональна загибель, партенокарпічне насіння, життєздатність насіння, гетерозиготність, інвазивні популяції, *Ulmus pumila* L., *Ulmus suberosa* Moench.

Відомо, що на поширення інвазивних видів рослин впливає рівень гетерозиготності насіння, який залежить від кількості особин, що утворюють інвазійні популяції, переzapиллюючись у її межах, та від походження інвазивних екземплярів рослин [1, 2]. Генетичне різноманіття інвазивних видів залежить також від гібридизаційних процесів зі спорідненими нативними видами місцевої флори [3]. Одним із показників генетичного стану популяцій є ембріональна загибель – досить мінлива репродуктивна ознака, яка вказує на відсоток насіння із відсутнім (партенокарпічне насіння), недорозвинутим чи загиблим (абортіваним) зародком у супліддях. Дійсно, у вітрозapильних рослин зародки досить часто абортуються після самозapилення внаслідок переходу в гомозиготний стан тих локусів, гетерозиготність яких забезпечується природним доббором, що може супроводжуватися збільшенням експресії шкідливих рецесивних, летальних або сублетальних генів [2]. Відсутність зародка в насінні може також бути наслідком випадіння запилення/зapліднення або пошкодження зародка чи ендосперму комахами або іншими тваринами [4, 5]. Ембріональна загибель як показник генетичного стану досить рідко використовується для аналізу популяцій. Тим не менш, поряд з іншими генетичними факторами, він є одним із важливих показників гетерозиготності та генетичного поліморфізму, що впливають на поширеність, конкуренцію та адаптацію інвазивних видів у різних кліматичних зонах та екологічних нішах. Отже, метою роботи було оцінити генетичний та репродуктивний стан популяцій *Ulmus pumila* L. та *Ulmus suberosa* Moench. за допомогою показників ембріональної загибелі насіння та життєздатності насіння для з'ясування механізмів зростання інвазивності цих видів у Степовому Придніпров'ї.

© КРАВЕЦЬ О. А., ПІРКО Я. В., КАЛАФАТ Л. О., РАБОКОНЬ А. М., БІЛОНОЖКО Ю. О., ПОСТОВОЙТОВА А. С., ЛИХОЛАТ Ю. В.

### Матеріали і методи

Об'єкти дослідження – *Ulmus pumila* L. – в'яз приземкуватий (низький, туркестанський, сибірський, карагач) із родини ільмових, або в'язових (Ulmaceae), один із найбільш проблемних південно-європейських інвазивних видів азійського походження, поширений на південному сході та в центральній частині України. *Ulmus suberosa* Moench, або *U. campestris* var. *suberosa* Wahl – в'яз корковий, також інвазивний вид азійського походження, розповсюджений майже по всій території України (крім Карпат і крайнього півдня). Обидва види диплоїди; каріотип *U. pumila* та *U. suberosa* складає  $2x=2n=28$  хромосом [6].

Насіння *U. pumila* було зібране в травні-червні 2018 р. в трьох популяціях передмістя Дніпра. Перша природна популяція (ПП1) була моновидовим угрупованням різновікових особин із високою щільністю деревостану: займала площу  $70 \times 80 \text{ м}^2$ . Друга (ПП2) та третя (ПП3) популяції характеризувалися меншою щільністю деревостану, присутністю інших деревних видів та більшою площею, ніж перша популяція ( $90 \times 80 \text{ м}^2$  та  $250 \times 30 \text{ м}^2$  відповідно). З 7 дерев у кожній популяції було проаналізовано по 200 насінин. Моновидова популяція насінневого походження іншого виду, *U. suberosa*, займала площу  $60 \times 5 \text{ м}^2$ ; в ній було проаналізовано 355 насінин із 14 дерев.

Ембріональну загибель (ЕЗ) та життєздатність насіння визначали, використовуючи цитологічні методи та метод пророщування насіння в чашках Петрі. Визначали схожість повноцінного (перебраного) насіння. Для аналізу ЕЗ диференціювали 5 категорій насіння (див. далі). Індекси ЕЗ та інших категорій насіння підраховували у відсотках, наприклад,  $\text{ЕЗ} = (\text{НЗ} + \text{ПН}) \cdot 100 / \text{ЗС}$ , де НЗ – насіння з недорозвиненим зародком, ПН – партенокарпічне насіння, ЗС – усе проаналізоване насіння разом. Аналіз та підрахунки ЕЗ проводили за допомогою стереооптичного мікроскопа та цифрової камери для макрозйомки (Canon).

### Результати та обговорення

*U. pumila* та *U. suberosa* – вітрозапильні, алогамні види, цвітіння яких у дослідженому регіоні України відбувається в березні і триває близько 2 тижнів до появи перших листків.

Плоди швидко дозрівають – у травні насіння вже сформоване. Схожість насіння значно варіює. Плід – плоский крилатий горішок із перетинчастими крилами, або крилатка (рис. 1, 2). Дозріле насіння сочевицеподібне, з повністю сформованим зародком, без ендосперму.

Для аналізу ембріональної загибелі диференціювали 5 типів насіння: 1) повноцінне насіння з повністю сформованими зародком та перикарпієм (рис. 1а, б; 2б, в); 2) насіння із зародком, сім'ядолі якого сягають менше від 1/2 повністю сформованого зародка (рис. 1в, 2в); 3) насіння з нерозвинутим зародком, розміри якого становлять 1/4 та менше від повністю сформованого зародка (рис. 1г, 2г); 4) насіння без зародка з перикарпієм (партенокарпічне насіння) (рис. 2д); 5) насіння, зародок якого пошкоджено комахами та іншими тваринами (рис. 1є, 2є).

***U. pumila.*** Показники ембріональної загибелі насіння дерев у першій популяції (ПП1) широко варіювали (від 17 до 64 %), складаючи, в середньому 41 % (рис. 2, 3). Частка насіння, ушкодженого комахами, складала в середньому 19 %, але іноді сягала 30 %. Відсоток повноцінного життєздатного насіння складав в середньому 40 %. Схожість такого насіння варіювала від 35 до 100 %, в середньому складаючи 57 %. Насіння з недорозвиненим зародком у лабораторних умовах (протягом двох тижнів) не проростало. Показники ембріональної загибелі насіння в другій популяції дерев (ПП2) теж були варіабельними, хоча значно нижчими – від 6 до 39 %, в середньому 26 % (рис. 2, 3). Частка насіння, ушкодженого комахами, не перевищувала 10 %, в середньому складаючи 2 %. Відсоток повноцінного насіння сягав 72 %, значно перевищуючи цей показник у першій популяції. Схожість насіння збільшилася до 79 %. При цьому насіння з недорозвиненим зародком характеризувалося досить високою схожістю.

Показники ембріональної загибелі насіння в третій популяції (ПП3) варіювали від 0 до 23 %, складаючи в середньому 13 % (рис. 3). Частка насіння, ушкодженого комахами, дорівнювала 4 %. Відсоток повноцінного насіння сягав в середньому 83 %, – це найбільший показник серед трьох досліджених популяцій. Схожість насіння була вищою, ніж у першій та другій популяціях, складаючи 80 %.

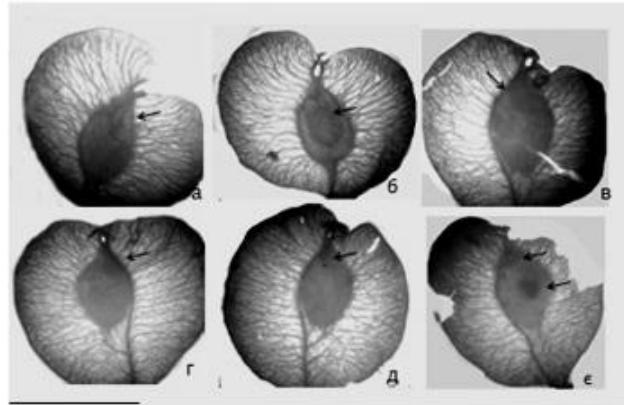


Рис. 1. Плід *U. pumila* – крилатий горішок, або крилатка. Різні категорії крилаток за ембріональним станом: а, б – повноцінне насіння; в, г – насіння з недорозвинутим зародком; д – партенокарпічне насіння; е – насіння, пошкоджене комахами. Масштаб: 1 см.

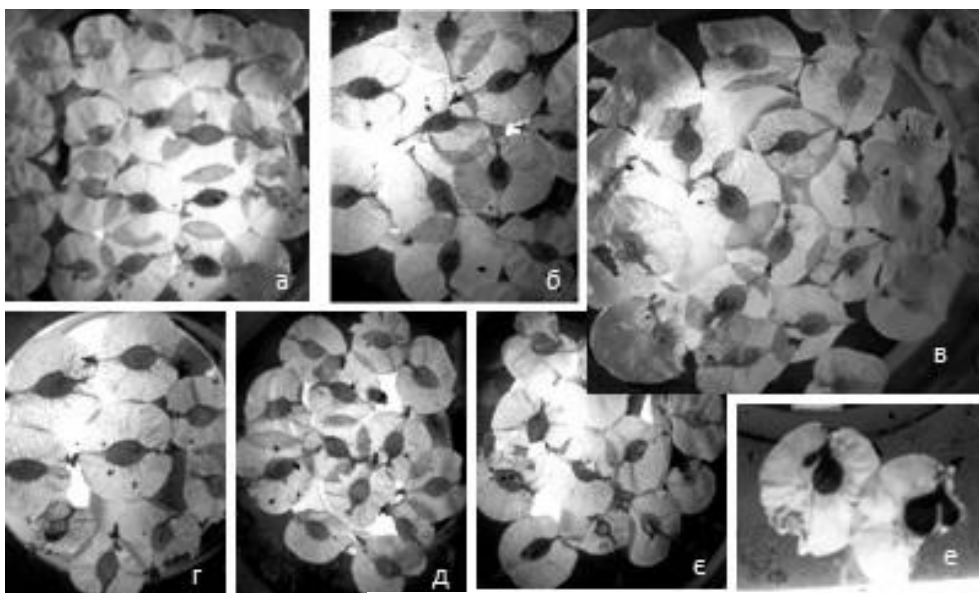
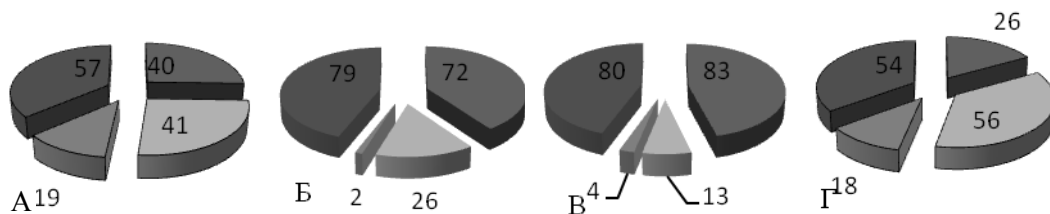


Рис. 2. Крилатки *U. pumila* (а, в, г) та *U. suberosa* (б, д-е), що відрізняються за ембріональним станом: а – суміш насіння, б, в – повноцінне насіння, ступінь розвитку зародка якого дещо варіює; г – насіння з недорозвинутим зародком; д – насіння з відсутнім зародком (партенокарпічне); е – насіння з близнюковими зародками; е – насіння, пошкоджене комахами.



■ – повноцінне насіння, %;  
 ■ – ембріональна загибель та партенокарпічне насіння, %;  
 ■ – насіння, пошкоджене комахами, %;  
 ■ – жисть насіння, %.

Рис. 3. Діаграма показників стану насіння у *U. pumila* з трьох популяцій (А, Б, В) та *U. suberosa* з однієї популяції (Г).

Отже, в передмісті Дніпра трапляються різні за репродуктивним та генетичним станом популяції *U. pumila*. У ПП1 показники ембріональної загибелі та пошкодженого насіння були досить високими, сягали 60 %; відсоток життєздатного насіння складав менше 50 %. ПП2 та особливо ПП3 характеризувалися низькими індексами ембріональної загибелі/пошкодження насіння (28/17 %) та відповідно високою його життєздатністю (79–80 %). Розміри сформованого зародка в насінні мали тенденцію до зменшення.

***U. suberosa***. Крилатки пробкового в'яза за розмірами трохи поступаються плодам в'яза приземкуватого. Для дерев аналізованої популяції властиві високі показники ембріональної загибелі насіння, що варіювали від 36 до 71 %, складаючи в середньому 56 % (рис. 2, 3). Частка пошкодженого тваринами насіння дорівнювала 18 %. Відсоток повноцінного насіння складав лише 26 %; його схожість становила 54 %. Схожість насіння з недорозвиненим зародком у лабораторних умовах не перевищувала 5,2 %. Отже, популяція *Ulmus suberosa* характеризується не тільки підвищеними індексами ембріональної загибелі, але й низькими показниками формування повноцінного насіння (при тому, що тільки половина з них є життєздатним). Тому насінневе відтворення цього виду у Степовому Придніпров'ї може суттєво лімітуватися.

Вважається, що індекс ембріональної загибелі свідчить про рівень гетерозиготності рослин [3, 4]. Підвищення індексів ЕЗ може вказувати на нестачу гетерозигот та надлишкову гомозиготність популяцій. Варіювання індивідуальних показників ЕЗ свідчить про гетерогенність популяції дерев за віком, генетичним та фізіологічним станом. Так, вік дерев нерідко корелює з рівнем їх генетичного поліморфізму. На варіювання ЕЗ за роками впливають і погодні умови [4]. Враховуючи високу насінневу продуктивність в'язів, варіювання ЕЗ в межах 26 % можна вважати незначним. Так, за даними наукової літератури, в *U. laevis* показник ЕЗ дуже різнився за роками та індивідуумами, складаючи, наприклад, у середньому  $25 \pm 24$  %;  $\text{min}$ -мах – 3–95 %; CV (коефіцієнт варіювання)=0.98 [4]. Отже, хоча підвищення індексів ЕЗ в одній із популяцій *Ulmus pumila* (ПП1) до 41 % є природним, однак це може свідчити про нестачу перезаплення та рівня гетерозиготності. Крім того, є свідчення, що у *U. pumila*, на відміну від

інших видів *Ulmus*, під час самозапилення утворюється життєздатне насіння [4], що може вказувати на виживаність гомозигот та низький рівень шкідливих мутацій у цього виду. Висока щільність природного деревостану, що буває наслідком вегетативного (клонального) розмноження, також впливає на ступінь гетерозиготності популяції [8].

Ембріональна загибель не завжди є негативним явищем; вона може свідчити про адаптивну стратегію виду, спрямовану на оптимізацію кількості насіння та захист від поїдання тваринами енерговитратного спадкового матеріалу [4,7]. Отже, підсумовуючи викладене, можна стверджувати, що рівень ембріональної загибелі є формою внутрішньовидової мінливості, на яку впливають як генетичні фактори, так і біотичні та абіотичні чинники навколишнього середовища, а також фізіологічний стан та вік особин. Генетичний стан дерев, імовірно, пов'язаний і з умовами зростання (наприклад, щільність деревостану), випадками самозапилення, клональною репродукцією, а також вихідною генетичною структурою материнських деревостанів. Дерев, що зростають у більш екологічно сприятливих умовах, характеризувалися кращим репродуктивним та генетичним станом. Більший показник ембріональної загибелі у зрілих дерев (порівняно з молодими) також може вказувати на нестачу гетерозигот ще у ранніх інтродуцентів. Ймовірно, рівень ЕЗ корелює з насінневою продуктивністю виду та циклічністю розмноження тварин, що поїдають насіння. Значніший показник ЕЗ у зрілих дерев (порівняно з молодими) може свідчити про їх походження, зокрема менший рівень гетерозиготності та генетичного поліморфізму, але це ще потребує подальшого вивчення.

### Висновки

• Досліджені популяції *U. pumila* зі Степового Придніпров'я відрізняються за показниками ембріональної загибелі та життєздатності насіння. Моновидова популяція з високою щільністю деревостою характеризувалася підвищеними індексами ембріональної загибелі, що може свідчити про нестачу гетерозигот. Дві інші популяції характеризувалися низькими показниками ембріональної загибелі та високими індексами насінневого відтворення, що, навпаки, може вказувати на збалансовану гетерозиготність. Можливість самозапилення у утворенням

життєздатного насіння підтверджують генетичний гомеостаз цього виду.

• Для інвазивної популяції *U. suberosa* характерними є високі показники ембріональної загибелі насіння та низькі індекси життєздатності насіння, що може бути зумовлено обмеженістю популяції та/або її поганим фізіологічним станом і зниженням рівня гетерозиготності. На-

сінневе відтворення інвазивних популяцій цього виду в умовах Степового Придніпров'я, ймовірно, лімітується.

Робота виконана за підтримки проекту «Популяційно-генетичний аналіз адвентивних видів в умовах впливу змін клімату на інвазійність рослин в Степовому Придніпров'ї» (2017–2018 рр).

## References

1. Sakai A.K., Allendorf F.W., Holt J.S., Lodge D.M., Molofsky J., With K.A., Baughman S. et al. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2001. Vol. 32. P. 305–332. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037.
2. Lo'pez-Almansa J.C., Gil L. Empty samara and pathenocarpy in *Ulmus minor* s.l. *Silvae Genet.* 2003. Vol. 52. P. 241–243.
3. Zalapa J.E., Brunet J. and Guries R.P. The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (Ulmaceae). *Evol. Appl.* 2010. Vol. 3 (2). P. 157–168. doi: 10.1111/j.1752-4571.2009.00106.x.
4. Perea R., Venturas M., Gil L. Empty Seeds Are Not Always Bad: Simultaneous Effect of Seed Emptiness and Masting on Animal Seed Predation. *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8 (6). e65573. PMID: PMC3679161. doi: 10.1371/journal.pone.0065573.
5. Venturas M., Fuentes-Utrilla P., Ennos R., Collada C., Gil L. Humaninduced changes on fine-scale genetic structure in *Ulmus laevis* Pallas wetland forests at its SW distribution limit. *Plant Ecol.* 2013. Vol. 214 (2). P. 317–327.
6. Santamour F.S.Jr. and Ware G.H., Chromosome numbers of new *Ulmus* (elm) taxa introduced from China. *Rhodora.* 1997. Vol. 99. P. 148–151.
7. Silvertown J.W. The evolutionary ecology of mast seeding in trees. *Biol J Linn Soc.* 1980. Vol. 14. P. 235–250.
8. López-Almansa J.C. Review. Reproductive ecology of riparian elms, *Invest Agrar: Sist Recur For.* 2004. Vol. 13 (1). P. 17–27.

**KRAVETS O. A.<sup>1</sup>, PIRKO Ya. V.<sup>1</sup>, KALAFAT L. O.<sup>1</sup>, RABOKON A. M.<sup>1</sup>, BILONOZHKO Yu. O.<sup>1</sup>, POSTOVOITOVA A. C.<sup>1</sup>, LYCHOLAT Yu. V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, vul. Osipovsky, 2a, e-mail: kravetshelen @ gmail.com

<sup>2</sup> Oles Honchar Dniprovsky National University, Ukraine, 49000, Dnipro, Gagarin ave., 72

## SEED EMBRYONIC DEATH IN INVASIVE POPULATIONS OF *ULMUS PUMILA* L. AND *ULMUS SUBEROSA* MOENCH IN THE STEPPE DNEIPER REGION

**Aim.** Analysis of seed embryonic death and seed viability as a indexes of the genetic and reproductive state of *Ulmus pumila* L. and *U. suberosa* Moench to determine the mechanisms of invasiveness of their populations in the Dnieper steppe. **Methods.** Morphological, anatomical, cytological, statistical. **Results.** Investigated *U. pumila* populations differed on indexis of the embryonic death, seed viability and seed productivity. Populations growing in more favorable environmental conditions are distinguished by a better reproductive, physiological, and genetic conditions. Two from three *U. pumila* populations are characterized by low rates of embryonic death, high viability indices and seed productivity. This can indicate their heterogeneous origin and a significant level of heterozygosity. Vice versa, *U. suberosa* population has a high rates of embryonic death of seeds and low seed viability which may be due to population's limited and/or its poor physiological state and a decrease in heterozygosity. **Conclusions.** There are different levels of heterozygosity in the *U. pumila* population at the steppe Dnieper. Probably seed reproduction and distribution of this species is not significantly limited by genetic, physiological or environmental factors. Populations of *U. suberosa* in this region are characterized by worse genetic status. Seed reproduction of invasive populations of this species can be significantly limited.

**Keywords:** seed embryonic death, empty samara, seed viability, heterozygosity, invasive populations, *Ulmus pumila* L., *Ulmus suberosa* Moench.