

И.И. Коршиков, Н.С. Терлыга, Е.М. Скидан, Е.В. Чемерис

**АНАЛИЗ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. И *PINUS PALLASIANA* D.DON ПО ДАННЫМ АЛЛОЗИМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В МАРГИНАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ**

сосна обыкновенная, сосна крымская, маргинальные популяции, аллозимный полиморфизм, филогенетические взаимоотношения

В Украине большинство хвойных пород находится на границе ареалов, где они обычно подвержены не только воздействию неблагоприятных природно-климатических факторов, но и все более возрастающей антропопрессии. Постоянно усиливающееся антропогенное влияние на лесные экосистемы, особенно периферийные, требует разработки целостной системы сохранения генофонда видов-эдикаторов и новых научно обоснованных подходов по их разумному хозяйственному использованию. Определение эволюционно сложившихся популяционно-генетических структур хвойных, выделение и генетическая паспортизация лесосеменных участков и плюсовых деревьев – начальный этап сбора базы данных для решения этих актуальных задач. На современном этапе развития популяционной биологии только при помощи методов биохимической генетики, в особенности доступного для широкого применения метода электрофоретического разделения изоферментов, можно получить необходимую информацию о генотипических особенностях исследуемых популяций, плантационных или других насаждениях и отдельных деревьев хвойных. Изучение генетической изменчивости по наследственным вариантам белков – один из наиболее эффективных методов анализа видового и межвидового разнообразия растений. При помощи дискретных изоферментных локусов можно на качественно новом уровне решать и фундаментальные проблемы ботаники – определять филогенетические взаимоотношения между видами [1, 5].

Целью нашей работы было выяснение генетических отличий между двумя видами сосны – обыкновенной и крымской на основе анализа изменчивости аллозимных локусов в двух маргинальных их популяциях.

Семена для последующего электрофоретического анализа были собраны с 20 деревьев сосны крымской в популяции, находящейся у поселка Никита в Горном Крыму. Сбор семян сосны обыкновенной проводили с 23 деревьев в популяции Изюмского лесничества Харьковской области. Электрофорез 10 ферментов, наименования которых приведены в таблице 1, проводили в вертикальных пластинках 7,5 % полиакриламидного геля с использованием трис-глицинового буфера (рН = 8,3). Для определения генотипа каждого дерева электрофоретически анализировали ферменты, экстрагируемые с 8 и более эндоспермов семян. Гистохимическое окрашивание ферментов на гелевых пластинках выполняли по общепринятым методикам. Для выяснения генетических отличий изучаемых видов использовали частоты аллелей и генотипов в анализируемых популяциях. Сходство аллельных частот и генотипического состава популяций сосны обыкновенной и сосны крымской оценивали с помощью показателя сходства ( $r$ ) и критерия идентичности ( $I$ ) Л.А.Животовского [4]. Для выяснения гетерогенности частот аллелей и генотипов применяли критерий  $\chi^2$ .

Установлено, что из 23 аллозимных локусов 10 изучаемых ферментных систем четыре локуса – Sod-1, Sod-2, Sod-3, Mdh-1 были мономорфными у обоих видов (табл.1). Из 69 выявленных электрофоретических вариантов изоферментов общими для обоих видов было 39. У сосны обыкновенной обнаружено 51, а у сосны крымской – 52 аллеля. 12 аллелей были характерны только для сосны крымской, из которых 8 были редкими, так как встречались с низкой частотой. 14 видовых аллелей было установлено в популяции сосны обыкновенной, половина из которых были редкими. При этом аллели, наиболее часто встречающиеся у сосны обыкновенной, также наиболее часты и у сосны крымской. Из 15 полиморфных локусов сосны обыкновенной у 11 наблюдаемая гетерозиготность была выше ожидаемой, а у сосны крымской это распределение было соответственно 18 и 15.

Таблица 1. Количественный состав аллелей и генотипов изоферментных локусов, их гетерозиготность в маргинальных популяциях сосны обыкновенной и сосны крымской

фермент, его обозначение	Локус	Сосна обыкновенная						Сосна крымская					
		Количество		Гетерозиготность		аллелей	генотипов	аллелей	генотипов	Гетерозиготность			
		аллелей	генотипов	ожидаемая	наблюдаемая					ожидаемая	наблюдаемая		
Глутаматоксало- ацетилтрансфераза ( GOT )	Got-1	1	1	0,000	0,000	2	2	0,043	0,043*	2	2	0,043	0,043*
	Got-2	2	3	0,500	0,500*	3	4	0,468	0,522*	3	4	0,468	0,522*
	Got-3	2	2	0,147	0,150*	2	3	0,423	0,435*	2	3	0,423	0,435*
Глутаматдегидрогеназа ( GDH )	Gdh-1	3	3	0,096	0,100*	2	3	0,340	0,348*	2	3	0,340	0,348*
Диафараза ( DIA )	Dia-1	3	4	0,266	0,300*	4	4	0,436	0,522*	4	4	0,436	0,522*
	Dia-2	3	4	0,452	0,400	3	3	0,123	0,130*	3	3	0,123	0,130*
	Dia-4	3	3	0,422	0,400	2	2	0,122	0,130*	2	2	0,122	0,130*
Кислая фосфатаза ( ACP )	Acp-1	4	5	0,402	0,400	3	4	0,600	0,545	3	4	0,600	0,545
Лейцинаминопептидаза ( LAP )	Lap-1	2	3	0,095	0,100*	2	2	0,180	0,200*	2	2	0,180	0,200*
	Lap-2	3	3	0,096	0,100	3	3	0,141	0,150*	3	3	0,141	0,150*
Малатдегидрогеназа ( MDH )	Mdh-1	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000
	Mdh-2	1	1	0,000	0,000	2	2	0,122	0,130*	2	2	0,122	0,130*
	Mdh-3	4	4	0,474	0,500*	3	4	0,435	0,522*	3	4	0,435	0,522*
	Mdh-4	4	5	0,599	0,400	2	3	0,463	0,364	2	3	0,463	0,364
Супероксиддисмутаза ( SOD )	Sod-1	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000
	Sod-2	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000
	Sod-3	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000
	Sod-4	2	2	0,095	0,100*	1	1	0,000	0,000	1	1	0,000	0,000
Форматдегидрогеназа ( FDH )	Fdh-1	2	2	0,147	0,150*	2	3	0,289	0,250	2	3	0,289	0,250
Алкогольдегидрогеназа ( ADH )	Adh-1	3	2	0,435	0,400	4	4	0,236	0,261*	4	4	0,236	0,261*
	Adh-2	1	1	0,000	0,000	2	2	0,043	0,043*	2	2	0,043	0,043*
Малик-энзим ( ME )	Me-2	1	1	0,000	0,000	2	2	0,172	0,190*	2	2	0,172	0,190*
	Me-3	3	4	0,474	0,500*	4	5	0,432	0,476*	4	5	0,432	0,476*

\* Различия достоверны при  $P < 0,05$ .

Таблица 2. Анализ гетерогенности аллелей и генотипов в маргинальных популяциях сосны обыкновенной и сосны крымской

Локус	Аллель		Генотип	
	I	$\chi^2$	I	$\chi^2$
Got-3	ns	ns	9,2*	6,9*
Gdh-1	6,1*	ns	10,9*	ns
Dia-2	ns	ns	9,6*	ns
Dia-4	ns	ns	23,7***	12,8**
Acp-1	ns	ns	12,8*	9,7*
Lap-1	6,0*	ns	ns	ns
Mdh-2	ns	ns	5,8*	ns
Mdh-3	28,0***	14,2**	16,8**	ns
Mdh-4	31,7***	19,5***	14,8**	9,7*
Sod-4	ns	ns	4,4*	ns
Fdh-1	10,3**	ns	18,3***	9,3*
Adh-1	ns	ns	10,8*	ns
Me-2	ns	ns	8,2**	ns
Me-3	26,1***	13,1*	14,8**	12,4*

**Примечание:** Различия достоверны при \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; n.s. – незначимо.

Достоверные отличия в частотах общих аллелей обнаружены для 6 из 14 полиморфных локусов по критерию идентичности и только в 3-х вариантах по критерию  $\chi^2$  (табл. 2). Наиболее значимыми они были в отношении локусов Mdh-3, Mdh-4 и Me-3. Существенная гетерогенность выявлена и в частотах отдельных аллелей: Dia-4<sup>1.10</sup>, Me-3<sup>0.80</sup>, Mdh-3<sup>0.85</sup>, Mdh-4<sup>0.90</sup>, Mdh-4<sup>1.00</sup> (при  $P < 0,05$ ), Mdh-3<sup>1.15</sup>, Me-3<sup>1.25</sup> (при  $P < 0,01$ ).

В результате исследований у *P. sylvestris* L. и *P. pallasiana* D. Don обнаружено 56 и 53 генотипов соответственно (табл. 1), из которых 40 были общими. По составу генотипов изученные популяции достоверно отличались по 13 локусам по критерию идентичности (I) и по 6 локусам по критерию  $\chi^2$  (табл. 2). По этому критерию исследуемые виды сосен различались по частотам 10 генотипов: Gdh<sup>1.10/1.12</sup>, Fdh<sup>1.00/1.05</sup>, Dia-4<sup>1.00/1.10</sup>, Acp<sup>1.00/1.02</sup>, Mdh-3<sup>1.00/1.00</sup>, Mdh-3<sup>0.86/0.86</sup>, Mdh-4<sup>0.85/1.00</sup>, Me-2<sup>1.00/1.15</sup>, Me-3<sup>1.00/1.00</sup>, Me-3<sup>0.80/0.80</sup> (при  $P < 0,05$ ).

Показатель сходства ( $r$ ) по аллельным частотам между двумя исследуемыми видами равен 0,904, а по генотипическому составу – 0,884. Коэффициент генетической дистанции ( $D_n$ ) М.Неи [6], наиболее часто использующийся в количественных оценках межпопуляционных и межвидовых отличий [10], для маргинальных популяций сосны обыкновенной и сосны крымской составил 0,044. Установленное значение  $D_n$  было больше тех, что описаны в литературе для популяций каждого из видов в исследуемых нами географических районах. Так, например, коэффициент генетической дистанции между тремя разновысотными группировками сосны крымской на одном макросклоне Горного Крыма, расположенными у его основания, в средней части и верхнем пределе, которые Ю.К. Подгорный [7] рассматривал как географические популяции, составил 0,010–0,013 [8]. Значения  $D_n$  для восьми пространственно разделенных популяций сосны крымской в Крыму колебались в пределах от 0,005 до 0,022 [12]. У сосны обыкновенной центральных и краевых изолированных популяций Восточной Европы (включая и наш район исследований) и Сибири минимальное значение  $D_n$  составило 0,005, максимальное – 0,042 при среднем для 18 изучаемых популяций – 0,017 [3]. Дистанция Неи между популяциями ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.), установленная на основе анализа изменчивости 27 изоферментных локусов, варьировала от 0,068 до 0,129, что в 4–13 раз было выше значений  $D_n$  в пределах одного из этих таксонов. При столь значительных величинах  $D_n$  исследуемые ели все же

рассматривались как подвиды [2]. Эмпирически накапливаемые данные показывают, что значения этого коэффициента между популяциями одного вида рода *Pinus* L., как правило, не превышают 0,03, для изолированных популяций могут достигать 0,06 [11], а между видами одной подсекции варьируют от 0,032 до 0,652 при среднем значении 0,24 [9].

Таким образом, исследования аллозимного полиморфизма показывают определенные генетические различия между маргинальными популяциями сосны обыкновенной и сосны крымской. Наши результаты, в сочетании с анализом литературных данных, свидетельствуют, что для выяснения филогенетических взаимоотношений между этими таксонами необходимо увеличить выборку изучаемых популяций, что позволит точнее установить уровень внутри- и межвидовой дифференциации.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – М.: Наука, 1989. – 328 с.
2. Гончаренко Г.Г., Потенко В.В. Параметры генетической изменчивости и дифференциации в популяциях ели европейской (*Picea abies* Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) // Генетика. –1991. – 27, № 10. – С. 1759–1772.
3. Гончаренко Г.Г., Силин А.Е., Ладутов В.Е. Исследование генетической структуры и уровня дифференциации у *Pinus sylvestris* L. в центральных и крайних популяциях Восточной Европы и Сибири // Генетика. – 1993. – 29, № 12. – С. 2019–2038.
4. Животовский Л.А. Показатель сходства популяций по полиморфным признакам // Журн. общ. биологии. – 1979. – 40, № 4 – С. 587–602.
5. Коршиков И.И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. – Киев: Наук. думка, 1996. – 238 с.
6. Ней М. Генетические расстояния и молекулярная таксономия // Вопросы общей генетики. Труды 14 междунар. Генетического конгресса. – М.: Наука, 1981. – С. 7–18.
7. Подгорный Ю.К. Методические рекомендации по выделению природных популяций растений в горных условиях. – Ялта: Б.и., 1988. – 23 с.
8. Терлига Н.С. Адаптивна мінливість сосни кримської (*Pinus pallasiana* D. Don) в насадженнях Кривбасу // Автореф... дис. канд. біол. наук. – Київ, 1999. – 19 с.
9. Шурхал А.В., Подогає А.В., Животовский Л.А. Уровни генетической дифференциации жестких сосен, род *Pinus*, подрод *Pinus*, по данным аллозимной изменчивости // Генетика. – 1993. – 29, № 1. – С. 77–90.
10. Шурхал А.В., Подогає А.В., Животовский Л.А. Филогенетический анализ рода *Pinus* по аллозимным локусам: генетическая дифференциация подродов // Генетика. –1991. – 27, № 5. – С. 1193–1205.
11. Millar C.I., Strauss S.H., Corkle M.T., Westfall R.P. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed cone pines (*Pinus* subsect. *Oocarpae*) // Systemat. Bot. – 1988. – 13. – P. 351–370.
12. Silin A.E., Goncharenko G.G. Allozyme variation in natural populations of Eurasian pinea. Population structure and genetic variation in geographically related and isolated populations of *Pinus nigra* Arnold. on the Crimean peninsula // Silvae genetica. – 1996. – 45, № 23. – P. 67–75.

ДВС НАН України

Получено 4.04.2000

УДК 580:634.942:581.13:502.7

Анализ филогенетических связей *Pinus sylvestris* L. и *Pinus pallasiana* D. Don по данным аллозимной изменчивости в маргинальных популяциях / Коршиков И.И., Терлига Н.С., Скидан Е.М., Чемерис Е.В. // Промышленная ботаника. – 2001. – Вып. 1. – С. 56–59.

На основании данных по электрофоретической изменчивости 23 аллозимных локусов, контролирующих 10 ген-ферментных систем, изучена генетическая дифференциация двух маргинальных популяций сосны обыкновенной (Харьковская обл.) и сосны крымской (Крым, п. Никита). Коэффициент генетической дистанции между этими популяциями составил 0,044, что, согласно литературным данным, выше его значений для каждого из видов в исследуемом районе.

Табл. 2 Библиогр.: 11

Analysis of phylogenetic links of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus pallasiana* D. Don by the data of allozymous variability in marginal populations / Korshikov I.I., Terliga N.S., Skidan E.M., Chemeris E.V. // Industrial botany. – 2001. – V. 1. – P. 56–59.

On the basis of electrophoretic variability data of 23 allozymous loci, encoded 10 gene-enzymous systems, genetic differentiation of 2 marginal populations of *Pinus sylvestris* L. (Kharkov region) and *Pinus pallasiana* D. Don (the Crimea, the settlement of Nikita) has been studied. The genetic distance coefficient between these populations was 0,044, which is, as to literary data, higher of its value for each of species in the sites investigated.