

И.И. Коршиков, Я.В. Пирко, Е.М. Горлова, Е.В. Чемерис

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ *PINUS SYLVESTRIS* L.,  
*PINUS KOCHIANA* KLOTZSCH EX C. KOCH И *PINUS MUGO* TURRA  
ПО ДАННЫМ ИЗОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

*Pinus sylvestris* L., *Pinus kochiana* Klotzsch ex C. Koch, *Pinus mugo* Turra, филогения, изоферменты

Филогения видов сосны верхней границы хвойных лесов Украинских Карпат и Крыма достаточно запутана. Сосну горную (*Pinus mugo* Turra), образующую узкое криволесье на границе альпийского пояса Украинских Карпат, рассматривают как самостоятельный вид [6], как разновидность сосны обыкновенной (*P. sylvestris* L.) [1], как составной элемент интрогрессивной гибридизации двух, а может быть четырех видов особого ряда *Montanae*, распространенных в горах Южной и Средней Европы [3]. Еще более сложным представляется систематическое положение сосны Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex C. Koch.), распространенной в Крыму и на Кавказе. Для номенклатуры этой крымско-кавказской сосны использовано 8 видовых и 17 названий меньшего ранга. Отдельные исследователи рассматривали *P. kochiana* как подвид или разновидность *P. sylvestris* [3, 11].

Степень филогенетических взаимосвязей между *P. mugo* и *P. sylvestris*, а также между *P. sylvestris* и *P. kochiana* и, вообще, между этими тремя видами можно определить более точно, используя современные методы геносистематики. Этому аналитическому направлению западные ботаники в последние годы отдают явное предпочтение в сравнении с традиционным систематическим анализом на основе описания количественных признаков [2]. Для выяснения межвидовой дивергенции в качестве генетических маркеров широко используют изоферменты как прямые продукты наследственного кода [4, 8, 10, 12].

Цель настоящей работы – выяснение филогенетических взаимосвязей между тремя коренными для Украины видами сосны: *Pinus sylvestris*, *P. kochiana* и *P. mugo*, на основе данных их аллозимной изменчивости в маргинальных природных популяциях.

Семена для последующего электрофоретического анализа были собраны с 11 деревьев в природной популяции *P. kochiana* в Горном Крыму. Сбор семян *P. sylvestris* проводили с 20 деревьев, произрастающих в Изюмском бору (Харьковская область), а *P. mugo* – с 18 деревьев в популяции Карпатского национального природного парка.

Электрофорез ферментов, экстрагируемых из эндоспермов семян, проводили в вертикальных пластинках 7,5% полиакриламидного геля с рН разделяющего геля 8,9 в триглициновом электродном буфере (рН 8,3) [14]. Для изучения генетической изменчивости видов в качестве молекулярно-генетических маркеров использовали изоферменты 9 ферментных систем: аспартатаминотрансферазы (ГОТ, К.Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназы (GDH, К. Ф. 1.4.1.2), диафазы (DIA, К. Ф. 1.6.4.3), малатдегидрогеназы (MDH, К. Ф. 1.1.1.37), супероксиддисмутазы (SOD, К. Ф. 1.15.1.1), алкогольдегидрогеназы (ADH, К. Ф. 1.1.1.1), формиатдегидрогеназы (FDH, К. Ф. 1.2.1.2), кислой фосфатазы (АСР, К. Ф. 3.1.3.2) и лейцинаминопептидазы (LAP, К. Ф. 3.4.11.1), синтез которых контролируется 20 генными локусами. Гистохимическое окрашивание ферментов на гелевых пластинках осуществляли по

Таблица 1. Число аллелей и генотипов в популяциях *Pinus mugo* Turra, *P. sylvestris* L. и *P. kochiana* Klotzsch ex C. Koch по изученным ферментным системам

| Фермент                                | Локус | Число              |                |                      |                    |                |                      |
|--|-------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|----------------|----------------------|
|  |       | аллелей            |                |                      | генотипов          |                |                      |
|  |       | <i>P. kochiana</i> | <i>P. mugo</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>P. kochiana</i> | <i>P. mugo</i> | <i>P. sylvestris</i> |
| Аспаргатамино-<br>трансфераза<br>(GOT) | Got-1 | 1                  | 2              | 1                    | 1                  | 2              | 1                    |
|  | Got-2 | 3                  | 2              | 2                    | 4                  | 2              | 3                    |
|  | Got-3 | 2                  | 3              | 3                    | 3                  | 4              | 4                    |
| Глутаматде-<br>гидрогеназа (GDH)       | Gdh   | 2                  | 2              | 2                    | 2                  | 3              | 3                    |
| Диафораза (DIA)                        | Dia-1 | 1                  | 3              | 2                    | 1                  | 4              | 2                    |
|  | Dia-2 | 1                  | 3              | 3                    | 1                  | 3              | 3                    |
|  | Dia-4 | 2                  | 2              | 1                    | 2                  | 3              | 1                    |
| Малатдегидрогеназа<br>(MDH)            | Mdh-2 | 1                  | 1              | 2                    | 1                  | 1              | 2                    |
|  | Mdh-3 | 2                  | 3              | 2                    | 3                  | 4              | 3                    |
|  | Mdh-4 | 2                  | 3              | 2                    | 2                  | 4              | 2                    |
| Супероксид-<br>дисмутаза (SOD)         | Sod-1 | 1                  | 1              | 1                    | 1                  | 1              | 1                    |
|  | Sod-2 | 1                  | 1              | 1                    | 1                  | 1              | 1                    |
|  | Sod-3 | 1                  | 1              | 1                    | 1                  | 1              | 1                    |
|  | Sod-4 | 1                  | 1              | 1                    | 1                  | 1              | 1                    |
| Формиатде-<br>гидрогеназа (FDH)        | Fdh   | 2                  | 2              | 2                    | 2                  | 2              | 2                    |
| Алкогольде-<br>гидрогеназа (ADH)       | Adh-1 | 2                  | 1              | 3                    | 2                  | 1              | 3                    |
|  | Adh-2 | 2                  | 1              | 1                    | 2                  | 1              | 1                    |
| Кислая фосфатаза<br>(ACP)              | Acp   | 3                  | 3              | 3                    | 3                  | 6              | 3                    |
| Лейцинами-<br>нопептидаза (LAP)        | Lap-1 | 2                  | 3              | 5                    | 2                  | 4              | 6                    |
|  | Lap-2 | 3                  | 2              | 3                    | 3                  | 2              | 4                    |
| <b>Всего</b>                           |       | 35                 | 40             | 41                   | 38                 | 50             | 47                   |

общепринятым методикам [7, 9]. Для выяснения генотипа дерева по каждому локусу изучали не менее 8 эндоспермов семян. Генетические различия между видами оценивали по частотам аллелей и генотипов в каждом локусе, используя для этих целей стандартный  $\chi^2$  – тест, критерии идентичности и показатели сходства Л.А. Животовского [5] и коэффициент генетической дистанции М. Нея [15].

При исследовании 9-ти ферментных систем стабильное выявление зон ферментной активности и удовлетворительная генетическая интерпретация электрофоретических спектров получены для 20 генных локусов, из которых четыре - Sod-1, Sod-2, Sod-3 и Sod-4 - у трех изученных видов были мономорфными (табл. 1). Из 53 выявленных электрофоретических вариантов

Таблица 2. Анализ гетерогенности аллелей и генотипов в популяциях *Pinus mugo* Turra, *P. sylvestris* L. и *P. kochiana* Klotzsch ex C. Koch

| Локус | Критерий $\chi^2$ |              |
|-------|-------------------|--------------|
|       | аллель            | генотип      |
| Got-1 | 0,88 (2)          | 1,77 (2)     |
| Got-2 | 16,9 (4)**        | 28,6 (8)***  |
| Got-3 | 12,2 (6)          | 28,2 (12)**  |
| Gdh   | 4,91 (2)          | 17,4 (4)**   |
| Dia-1 | 7,45 (4)          | 17,4 (6)**   |
| Dia-2 | 0,93 (4)          | 1,82 (4)     |
| Dia-4 | 15,8 (4)**        | 30,1 (6)***  |
| Mdh-2 | 0,73 (2)          | 1,43 (2)     |
| Mdh-3 | 36,7 (6)***       | 40,9 (10)*** |
| Mdh-4 | 10,4 (4)*         | 20,9 (6)**   |
| Adh-1 | 5,56 (6)          | 11,5 (6)     |
| Adh-2 | 3,88 (2)          | 7,93 (2)*    |
| Fdh   | 0,67 (2)          | 8,65 (4)     |
| Acp   | 12,8 (4)*         | 21,6 (10)*   |
| Lap-1 | 19,2 (10)*        | 28,3 (14)*   |
| Lap-2 | 4,13 (4)          | 4,07 (6)     |

Примечание. Уровень значимости: \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

изоферментов общими было 28 у всех изученных видов. У *P. kochiana* обнаружено 35, а у *P. mugo* и *P. sylvestris* – 40 и 41 аллель, соответственно. Из них видоспецифическими, выявляемыми только у данных видов, у *P. kochiana* были 4, а у *P. sylvestris* и *P. mugo* – 7 аллелей. Наиболее часто встречающиеся аллели *P. sylvestris* (с частотой  $i > 0,500$ ) отмечены и у двух других исследуемых видов, за исключением локусов Got-2, Mdh-3 и Acp. Так, основной аллель (1.00) локуса Got-2 у *P. kochiana* и *P. mugo* имел низкую частоту встречаемости у *P. sylvestris*. Основные аллели локусов Mdh-3 и Acp (1.00) у *P. kochiana* и *P. sylvestris* отмечены с низкой частотой у *P. mugo*. Достоверная аллельная гетерогенность по критерию  $\chi^2$  обнаружена для 6 из 16 полиморфных локусов (табл. 2). Наиболее существенной она была в локусах Got-2, Dia-4, Mdh-3 у этих трех видов.

В результате проведенных исследований у изучаемых видов обнаружен 71 генотип. Из них *P. kochiana* принадлежало 38, *P. sylvestris* – 47, а *P. mugo* – 50 генотипов. Достоверные различия по частотам генотипов у изучаемых видов сосны выявлены в 10 из 16 полиморфных локусов (табл. 2).

Генетическая дистанция М. Нея, наиболее часто используемая для оценки генетических различий между отдельными таксонами, была минимальной между *P. kochiana* и *P. sylvestris* – 0,043 и максимальной между *P. sylvestris* и *P. mugo* – 0,114, а между *P. kochiana* и *P. mugo* она составила 0,072. Следует отметить, что коэффициент  $D_N$  обычно составляет 0,1 между видами и приблизительно 0,058 – между подвидами одной подсекции [13]. Согласно полученным значениям  $D_N$ , наиболее сходными оказались генетические структуры *P. kochiana* и *P. sylvestris*,

Таблица 3. Показатели сходства (r), рассчитанные на основе частот аллелей (выше диагонали) и генотипов (ниже диагонали) между популяциями *Pinus mugo* Turra, *P. sylvestris* L. и *P. kochiana* Klotzsch ex C. Koch

| Вид                  | <i>P. kochiana</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>P. mugo</i> |
|----------------------|--------------------|----------------------|----------------|
| <i>P. kochiana</i>   | —                  | 0,947                | 0,921          |
| <i>P. sylvestris</i> | 0,869              | —                    | 0,871          |
| <i>P. mugo</i>       | 0,826              | 0,786                | —              |

а наиболее генетически дивергированными – *P. sylvestris* и *P. mugo*. В то же время, при изучении популяций *P. sylvestris* и *P. mugo* из смежных участков их природных ареалов (Украинские Карпаты) значение генетической дистанции оказалось значительно ниже, составив при этом в среднем 0,065 [10]. На большее генетическое сходство между видами *P. kochiana* и *P. sylvestris* указывают также значения показателей сходства (r) (табл.3), рассчитанные по частотам аллелей и генотипов согласно методике Л.А. Животовского [5].

Л.Ф. Правдин [11] сосну Коха относил к подвиду сосны обыкновенной – *P. sylvestris* ssp. *hamata*. Полученные нами значения коэффициента генетической дистанции М. Нея между *P. sylvestris* и *P. kochiana*, в общем-то, подтверждают это мнение. Значения этого коэффициента достаточно велики, однако не выходят за рамки его изменений для популяций *P. sylvestris* Восточной Европы и Сибири [4]. На основе этих и ранее полученных данных [10] можно предположить, что равнинные маргинальные популяции, в отличие от реликтовых популяций *P. sylvestris* Украинских Карпат, имеют большее генетическое расхождение с *P. mugo*. Степень генетической дивергенции трех изучаемых видов можно точнее проследить на основе более полного популяционно-генетического анализа. Очень важно исследовать возможность интрогрессивной гибридизации между этими видами в смежных ареалах. Метод электрофоретического анализа изоферментов эндоспермов и зародышей семян вполне позволяет это сделать.

1. Андреев В.Н. Дендрология. Голосеменные: в 2-х частях. – К.: Госиздат Украины, 1925. – Ч. 1. – 200 с.
2. Антонов А.С. О возможных причинах расхождения взглядов фено- и геносистематиков на филогению и систему высших растений // Бот. журн. – 2000. – 85, № 1. – С. 3–11.
3. Бобров Е. Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 189 с.
4. Гончаренко Г.Г., Силин А.Е., Падутов В.Е. Исследование генетической структуры и уровня дифференциации у *Pinus sylvestris* L. в центральных и краевых популяциях Восточной Европы и Сибири // Генетика. – 1993. – 29, № 12. – С. 2019–2037.
5. Животовский Л.А. Показатель сходства популяций по полиморфным признакам // Журн. общ. биологии. – 1979. – 40, № 4. – С. 587–602.
6. Кондратюк Є.М. Дикоростучі хвойні України. – К.: Б.и., 1960. – 120 с.
7. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. – М: Наука, 1977. – 275 с.
8. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Скидан Е.М., Чемерис Е.В. Анализ филогенетических связей *Pinus sylvestris* L. и *Pinus pallasiana* D.Доп по данным аллозимной изменчивости в маргинальных популяциях // Пром. ботаника. – 2001. – Вып. 1. – С. 56–59.
9. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск: Наука, 1986. – 250 с.
10. Пірко Я.В. Популяційно-генетична мінливість трьох корінних видів роду *Pinus* L. в Українських Карпатах і Розточчі. Автореф. дис....канд. біол. наук. – К.: Б.в., 2001. – 20 с.
11. Правдин Л. Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. – Москва: Наука, 1964. – 192 с.

12. Шурхал А.В., Подогаас А.В., Животовский Л.А. Филогенетический анализ рода *Pinus* по аллозимным локусам; генетическая дифференциация подродов // Генетика. – 1991. – 27, № 5. – С. 1193–1205.
13. Шурхал А.В., Подогаас А.В., Животовский Л.А. Уровни генетической дифференциации жестких сосен род *Pinus*, подрод *Pinus*, по данным аллозимной изменчивости // Генетика. – 1993. – 29, № 1. – С. 79–90.
14. Davis B.J. Disk electroforesis. II. Methods and applications to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 67 – 65.
15. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. – 1972. – V. 106. – P. 283 – 292.

ДБС НАН Украины

Получено 12.02.2002

УДК 581.15:634.942:582.475.4(477)

Филогенетические взаимосвязи между *Pinus sylvestris* L., *Pinus kochiana* Klotzsch ex C. Koch и *Pinus mugo* Turra по данным изоферментного анализа / Коршиков И.И., Пирко Я.В., Горлова Е.М., Чемерис Е. В. // Промышленная ботаника. – 2002. – Вып. 2. – С. 192–196.

На основе данных изоферментного анализа 9 ген-ферментных систем изучены филогенетические взаимосвязи между *Pinus sylvestris* L., *P. kochiana* Klotzsch ex C. Koch и *P. mugo* Turra. Для исследований использовали выборки из 11–20 деревьев в трех маргинальных популяциях этих видов: *P. mugo* в Украинских Карпатах, *P. sylvestris* в Харьковской области, *P. kochiana* в Горном Крыму. Установлено, что *P. sylvestris* и *P. kochiana* имеют более сходные генетические структуры, нежели *P. sylvestris* и *P. mugo*. Генетическая дистанция М. Нея между изученными видами варьировала в пределах 0,043–0,114.

Табл. 3. Библиогр.: 15.

UDC 581.15:634.942:582.475.4(477)

Phylogenetic links between *Pinus sylvestris* L., *Pinus kochiana* Klotzsh ex C. Koch and *Pinus mugo* Turra according to the data of isozyme analysis / Korshikov I. I., Pirko Ya. V., Gorlova E. M., Chemeris E. V. // Industrial botany. – 2002. – V.2. – P. 192–196.

Phylogenetic links between *Pinus sylvestris* L., *Pinus kochiana* Klotzsh ex C. Koch and *Pinus mugo* Turra have been studied using the data of 9 gene-enzyme systems isozyme analysis. 11–20 trees has been sampled from 3 natural populations of these species: *P. mugo* – in the Ukrainian Carpathians, *P. sylvestris* – in Kharkov district, *P. kochiana* – in the Mountaineous Crimea have been employed in the investigations. Genetic structure of *P. sylvestris* and *P. kochiana* have been found to be more close, than those of *P. sylvestris* and *P. mugo*. M. Ney's genetic distance between the species under study varied within the ranges of 0,043 to 0,114.

Tabl. 3. Bibliogr.: 15.