



І.І. КОРШИКОВ<sup>1</sup>, А.М. ЛІСНІЧУК<sup>2</sup>,  
Т.І. ВЕЛИКОРИДЬКО<sup>1</sup>, Л.О. КАЛАФАТ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Донецький ботанічний сад НАН України  
пр. Ілліча, 110, м. Донецьк, 83059, Україна  
*herb@herb.dn.ua; donetsk-sad@mail.ru*

<sup>2</sup> Кременецький ботанічний сад  
вул. Ботанічна, 5, м. Кременець, Тернопільська обл., 47003, Україна  
*krembotsad@rambler.ru*

**СПОЛУЧЕНІСТЬ АЛОЗИМНОЇ МІНЛИВОСТІ  
ІЗ ЗАБАРВЛЕННЯМ НАСІННЯ  
*PINUS SYLVESTRIS* L. У ПОПУЛЯЦІЯХ  
КРЕМЕНЕЦЬКОГО ГОРБОГІР'Я  
ТА МАЛОГО ПОЛІССЯ**

*Ключові слова: сосна звичайна, реліктові популяції, забарвлення насіння, алозимна мінливість, сполученість*

Пошук сполученості мінливості моно- і полігенних кількісних ознак — одне із головних завдань популяційної біології та генетики. Концептуальним підходом його експериментальному вирішенні є аналіз популяційного розподілення мінливості кількісної ознаки або їх сукупності на тлі гетерозиготності рослин. Якщо кількісна ознака задіяна у процесах адаптації рослин до умов середовища, то гетерозиготність особин у популяції має розподілятися невипадковим чином [1]. Забарвлення насіння у *Pinus sylvestris* L. вважається генетично детермінованою ознакою [2], хоча його зв'язок з внутрішньопопуляційною спадковою гетерогенністю рослин не досліджено.

Слід зазначити, що мінливість забарвлення насіння у цього виду вивчало багато дослідників, зокрема Л.Ф. Правдін [8] та В.Л. Черепнін [9]. Основним забарвленням насіння є чорне, коричнєве, жовте, строка-

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

*ISSN 0372-4123. Укр. ботан. журн., 2009, т. 66, № 6*

**857**



те і беж. Встановлено, що забарвлення насіння — це стабільна ознака, бо не змінюється впродовж усього онтогенезу дерева [8]. С. Соколовський, вивчаючи забарвлення насіння *P. sylvestris* у Польщі, припускає, що «спочатку було дві різновидності з темним і світлим насінням, які потім утворили інші проміжні форми» (цит. за [8], с. 73). Мінливість забарвлення насіння досліджували у різних частинах ареалу *P. sylvestris*, а також у межах окремих природних популяцій [2, 7—9]. У багатьох публікаціях вказується, що на півночі ареалу *P. sylvestris* переважають дерева з чорним насінням [8, 9]. Кількість світлого насіння збільшується в сухих екотопах південної частини ареалу виду [9]. Цікавим є визначення забарвлення насіння в реліктових популяціях *P. sylvestris* та його зв'язок з генетичною мінливістю материнських дерев. У таких популяціях збереглися гени, які забезпечували пристосування популяцій до суттєво варіюючих умов природного середовища впродовж змін багатьох поколінь [4].

Мета нашої роботи — визначення сполученості мінливості забарвлення насіння з генетичними особливостями дерев реліктових популяцій *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я та Малого Полісся.

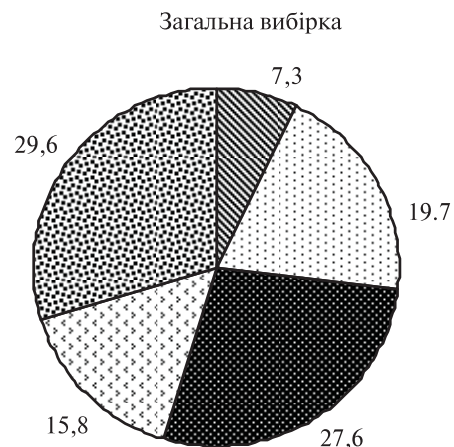
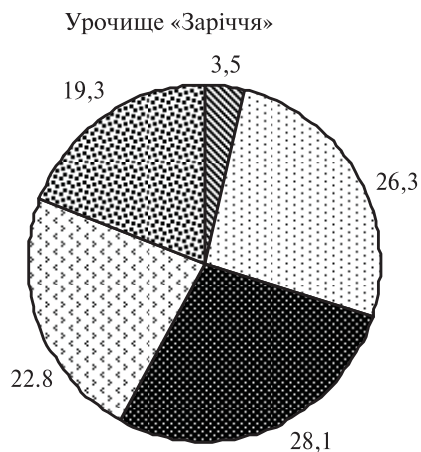
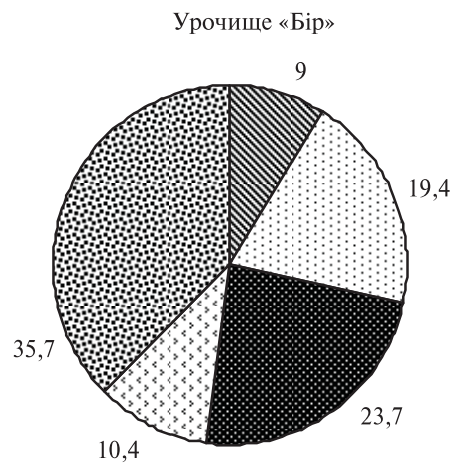
#### Об'єкти та методи досліджень

Нормальні непошкоджені шишки відстрілювали взимку з дерев *P. sylvestris* заввишки до 30 м близько 140-річного віку в трьох реліктових популяціях Кременецького горбогір'я та Малого Полісся: урочищах «Суразька дача», «Заріччя», «Бір». Кількість дерев, залучених до дослідження, в різних популяціях варіювала від 30 до 67, всього 152. З кожного дерева брали не менше п'яти шишок, аналізували лише нормально розвинене насіння. Забарвлення насіння визначали для кожного дерева популяції, виділяючи чорне, коричневе, строкате, жовте та беж, а потім об'єднували ці дерева в п'ять окремих вибірок.

Генетичний поліморфізм *P. sylvestris* досліджували, використовуючи як молекулярно-генетичні маркери ізоферменти дев'яти ферментних систем: алкогольдегідрогенази (ADH), глутаматоксалоацетаттрансамінази (GOT), діафориази (DIA), глутаматдегідрогенази (GDH), малатдегідрогенази (MDH), кислої фосфатази (ACP), лейцинамінопептидази (LAP), супероксиддисмутази (SOD), форміатдегідрогенази (FDH). В електрофоретичному аналізі ферментів, який проводили 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 попередній публікації, присвяченій дослідженням популяційно-генетичної мінливості *P. sylvestris* [5].

Шляхом електрофорезу визначено алелі 19 алозимних локусів, які використовували для розрахунку показників генетичного поліморфізму, генетичної дистанції за М. Неєм [10] у п'яти вибірках дерев з різним забарвленням насінин. Гетерогенність частот алелів та генотипів оцінювали за стандартним  $\chi^2$ -тестом [3].





Розподіл дерев за забарвленням насіння в реліктових популяціях *Pinus sylvestris* L. Кременецького горбогір'я та Малеого Полісся: 1 — жовте, 2 — беж, 3 — коричневе, 4 — чорне, 5 — строкате

The three distribution on the seeds coloration in the relict populations of *Pinus sylvestris* L. of Kremetske Horbohiriya and Male Polissia: 1 — yellow, 2 — beige, 3 — brown, 4 — black, 5 — motley seeds

### Результати досліджень та їх обговорення

У реліктових популяціях *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я та Малеого Полісся найпоширенішими були дерева зі строкатим та коричневим насінням, відповідно, 14,3—37,3, у середньому 29,6 % та 23,7—35,7, у середньому 27,6 % (рисунок). Значно менше траплялося дерев з чорним — 10,4—22,8 (сер. 15,8 %), бежевим — 7,1—26,3 (сер. 19,7 %), а найменше — з жовтим 3,5—10,7 (сер. 7,3 %)

Таблиця 1. Кількість алелів та генотипів, середнє за локусами значення гетерозиготності у вибірках дерев *Pinus sylvestris* L. з різним забарвленням насіння в реліктових популяціях Кременецького горбогір'я та Мало́го Полісся

Фермент	Локус	Кількість алелів та генотипів у вибірках дерев з різним забарвленням насіння					Наявна та очікувана гетерозиготність				
		жовте	беж	корич- неве	чорне	стро- кате	жовте	беж	корич- неве	чорне	стро- кате
Алкогольдегідрогеназа	Adh-1	1/1	2/3	3/3	2/3	2/3	0,000	0,067	0,095	0,167	0,111
	Adh-2	2/2	3/3	2/3	3/4	2/2	0,000	0,180	0,092	0,278	0,180
Глутаматдегідрогеназа	Gdh	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	0,182	0,233	0,048	0,167	0,067
							0,165	0,210	0,210	0,223	0,064
Глутаматоксалоацетаттрансаміназа	Got-1	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	0,545	0,633	0,548	0,458	0,467
	Got-2	2/3	2/3	2/3	2/2	2/3	0,496	0,499	0,466	0,429	0,437
	Got-3	3/3	2/3	2/3	2/3	2/3	0,000	0,067	0,000	0,042	0,044
							0,000	0,064	0,000	0,041	0,043
Діафораза	Dia-1	3/4	3/4	2/3	3/4	3/5	0,636	0,367	0,429	0,458	0,400
							0,500	0,433	0,444	0,353	0,459
	Dia-2	1/1	1/1	2/2	2/2	3/3	0,545	0,333	0,333	0,417	0,511
							0,458	0,420	0,444	0,469	0,484
	Dia-4	1/1	2/2	3/3	2/2	3/3	0,455	0,533	0,333	0,208	0,467
							0,516	0,493	0,428	0,484	0,494
Кисла фосфатаза	Acp	3/3	2/3	4/5	3/4	4/5	0,000	0,000	0,071	0,042	0,044
							0,000	0,000	0,069	0,041	0,043
Лейцинаміннопептидаза	Lap-1	2/2	4/4	4/5	2/2	3/5	0,000	0,067	0,119	0,00	0,111
	Lap-2	3/3	4/4	4/5	2/2	4/4	0,000	0,064	0,114	0,08	0,107
Малатдегідрогеназа	Mdh-2	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	0,455	0,367	0,333	0,417	0,422
	Mdh-3	2/2	2/2	2/3	2/2	2/3	0,367	0,375	0,310	0,385	0,375
Супероксиддисмутаза	Sod-1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0,182	0,200	0,238	0,167	0,244
	Sod-2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0,165	0,185	0,256	0,152	0,292
	Sod-3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0,273	0,300	0,238	0,250	0,222
	Sod-4	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	0,243	0,266	0,255	0,219	0,203
Форміатдегідрогеназа	Fdh	2/3	2/3	2/3	2/3	2/2	0,000	0,067	0,071	0,083	0,044
							0,000	0,064	0,069	0,080	0,043
Разом	—	33/37	39/46	41/51	37/44	43/53	0,182	0,500	0,405	0,542	0,444
							0,165	0,375	0,452	0,395	0,411
							0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
							0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
							0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
							0,000	0,000	0,000	0,000	0,022
							0,000	0,000	0,000	0,000	0,022
							0,182	0,300	0,167	0,125	0,311
							0,298	0,340	0,191	0,186	0,263

насінням. З темнозабарвленим насінням (чорне + коричневе) найменше дерев виявлено в урочищі «Бір» (34,1 %), а найбільше — в урочищі «Заріччя» (50,9 %), що в середньому для трьох популяцій становить 43,4 %. Можна стверджувати, що в реліктових популяціях на південній межі природного поширення *P. sylvestris* переважають дерева зі строкатим та світлим забарвленням насіння. За цим фенопоказником реліктові популяції *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я та Малого Полісся відрізняються від популяцій північної частини видового ареалу [8, 9].

За допомогою електрофоретичного аналізу 9 ферментів 152 дерев *P. sylvestris* виявлено 49 алелів 19 локусів, три з яких — Sod-1, Sod-2, Sod-3 — є мономорфними (табл. 1). Мінімальну кількість алелів знайдено у найменшій вибірці дерев (11) з жовтим насінням — 33, або 67,3 % від загальної їх кількості. У найрепрезентативніших вибірках дерев з коричневим (42) і строкатим (45) насінням відзначено, відповідно, 41 (83,7 %) і 43 (87,8 %) алелів. Для загальної вибірки встановлено 65 генотипів 19 локусів. Їх кількість в окремих вибірках залежала від кількості дерев: 37 (56,9 %) — у дерев з жовтим, 51 (78,5 %) — з коричневим та 53 (81,5 %) — зі строкатим насінням.

Наймінливішими були шість локусів — Gdh, Got-2, Got-3, Dia-1, Asp і Mdh-3, середня наявна гетерозиготність за якими в усіх п'яти вибірках дерев перевищувала 33 %, за двома винятками. За жодним із 16 поліморфних локусів не простежується будь-якої очевидної зміни гетерозиготності між вибірками дерев з чорним та найсвітлішим насінням.

Частота предомінантного алеля всіх 16 поліморфних локусів у кожній вибірці дерев була  $\geq 0,500$ . У зміні частот найпоширеніших алелів у п'яти вибірках дерев від чорного до жовтого насіння не простежується будь-який виражений тренд. Порівнюючи всі п'ять вибірок, ми виявили суттєву алельну гетерогенність за локусом Got-3, оцінену за допомогою  $\chi^2$ -тесту. Попарно порівнюючи вибірки, значущу алельну гетерогенність відзначено в п'яти випадках в окремих пар, а генотипову — у трьох випадках. Отже, відсутність значної алельної та генотипової неоднорідності в п'яти внутрішньопопуляційних групах дерев

Таблиця 2. Значення основних показників генетичного поліморфізму вибірок дерев *Pinus sylvestris* з різним забарвленням насіння в реліктових популяціях Кременецького горбогір'я та Малого Полісся

Забарвлення насіння	Частка поліморфних локусів, $P_{99}$	Середня кількість алелів на локус, A	Середня гетерозиготність		Індекс фіксації Райта, F
			очікувана, $H_E$	наявна, $H_O$	
Жовте	0,526	1,737	$0,178 \pm 0,023$	$0,191 \pm 0,025$	-0,073
Беж	0,739	2,053	$0,209 \pm 0,015$	$0,212 \pm 0,015$	-0,014
Коричневе	0,739	2,158	$0,200 \pm 0,013$	$0,180 \pm 0,012$	0,100
Чорне	0,790	1,947	$0,201 \pm 0,006$	$0,186 \pm 0,007$	0,075
Строкате	0,842	2,263	$0,206 \pm 0,012$	$0,207 \pm 0,012$	-0,005
Середнє	0,789	2,579	$0,205 \pm 0,007$	$0,196 \pm 0,007$	0,044



чітко не вказує на сполученість випадково проаналізованих 16 поліморфних локусів з особливостями забарвлення насіння дерев.

За часткою поліморфних локусів і середньою кількістю алелів на локус відрізнялись групи дерев з різним забарвленням насіння (табл. 2). Але найімовірніше це пов'язано з різним обсягом вибірок. За точнішим показником — середньою наявною або очікуваною гетерозиготністю — суттєвих відмінностей у досліджуваних вибірках дерев *P. sylvestris* не встановлено. Жодна з внутрішньопопуляційних груп з однаковим забарвленням насіння не має переваги щодо гетерозиготності. Тобто гетерозиготність рослин у популяціях розподіляється випадково, незалежно від забарвлення їх насіння. Тому цю ознаку, згідно з концептуальним положенням Ю.П. Алтухова [1] про сполученість мінливості моногенних та окремих полігенних ознак, не можна вважати адаптивно значущою для *P. sylvestris*. Підтвердженням цього є те, що різнозабарвлене насіння чітко не відрізняється за якістю — як і сянці, отримані з нього [9].

Для об'єднаної вибірки дерев характерна нестача гетерозигот у 2,7 %, за коефіцієнтом інбридингу особин ( $F_{IS}$ ) щодо популяції. На генетичну мінливість між п'ятьма вибірками дерев з різним забарвленням насіння припадає лише 1,1 % від загальної мінливості ( $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$ ). Найбільшим у цю міжвибіркову мінливість був внесок п'яти локусів — *Gdh*, *Adh-1*, *Mdh-3*, *Got-3* і *Got-2*. Це зовсім інші локуси, мінливість яких визначає підрозділення трьох вихідних популяцій. До них, зокрема, належать локуси *Dia-4*, *Adh-2*, *Dia-1* і *Sod-4*. До того ж підрозділення трьох популяцій було дещо меншим ( $F_{ST} = 0,8$  %,  $G_{ST} = 0,7$  %), ніж вибірок з них дерев з різним забарвленням насіння [6].

Внутрішньопопуляційна диференціація дерев за забарвленням насіння також була вищою, ніж генетична диференціація трьох популяцій, з яких виділено ці вибірки. Так, коефіцієнт генетичної дистанції Нея ( $D_N$ ) [10] між вибірками дерев з різним забарвленням варіював від 0,002 до 0,014 (сер. — 0,006). Між трьома вихідними популяціями  $D_N$  змінювався в межах 0,001—0,005 (сер. — 0,003) [6]. За середніми значеннями у першому випадку  $D_N$  був більшим удвічі. Все це підтверджує генетичну детермінованість ознаки забарвлення насіння у *P. sylvestris*.

Таким чином, забарвлення насіння — генетично зумовлена ознака *P. sylvestris* — за даними проведеного аналізу виявилась функціонально не значущою, а тому і не задіяна у процес адаптації популяцій. Це підтверджує випадковий характер розподілу гетерозиготності рослин у популяціях незалежно від забарвлення їх насіння та відсутність гетеротипової селекції. Якщо б таке відбувалось, ми б отримали суттєві відмінності у середній гетерозиготності вибірок дерев з тим чи іншим забарвленням насіння.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 3-е изд. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. — 431 с.
2. Видякин А.И. Методические аспекты выделения фенотипов растений на примере сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Уч. зап. НТГСПА: Мат-лы VI Всерос. популяц. семинара (2—6 декабря 2002 г., г. Нижний Тагил). — Нижний Тагил, 2004. — С. 29—35.





3. *Животовский Л.А.* Популяционная биометрия. — М.: Наука, 1991. — 271 с.
4. *Майр Э.* Популяции, виды и эволюция. — М.: Мир, 1974. — 460 с.
5. *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.
6. *Коршиков И.И., Лисничук А.Н., Великоридько Т.И., Калафат Л.А.* Генетическая изменчивость сосны обыкновенной в реликтовых популяциях Кременецкого холмогорья и Малого Полесья // Доп. НАН України. — 2008. — № 12. — С. 141—145.
7. *Мамаев С.А.* Формы внутривидовой изменчивости древесных растений (на примере семейства *Pinaceae* на Урале). — М.: Наука, 1973. — 284 с.
8. *Правдин Л.Ф.* Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. — М.: Наука, 1964. — 192 с.
9. *Черепнин В.Л.* Изменчивость семян сосны обыкновенной. — Новосибирск: Наука, 1980. — 182 с.
10. *Nei M.* Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. — 1972. — **106**. — P. 283—292.

Рекомендує до друку

Надійшла 05.05.2009

Е.Л. Кордюм

*И.И. Коршиков<sup>1</sup>, А.Н. Лисничук<sup>2</sup>, Т.И. Великоридько<sup>1</sup>, Л.А. Калафат<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Донецкий ботанический сад НАН Украины

<sup>2</sup> Кременецкий ботанический сад, Тернопольская обл.

#### СОПРЯЖЕНИЕ АЛЛОЗИМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ С ОКРАСКОЙ СЕМЯН *PINUS SYLVESTRIS* L. В ПОПУЛЯЦИЯХ КРЕМЕНЕЦКОГО ХОЛМОГОРЬЯ И МАЛОГО ПОЛЕСЬЯ

Определяли сопряжение окраски семян с генетическими особенностями 152 деревьев трех реликтовых популяций *Pinus sylvestris* L. Кременецкого холмогорья и Малого Полесья. Наиболее встречаемые в популяциях были деревья с пестрыми (14,3—37,3 %) и коричневыми семенами (23,7—35,7 %). Пять групп деревьев с разной окраской семян существенно не отличались по среднему уровню гетерозиготности ( $H_o = 0,180—0,212$ ,  $H_E = 0,178—0,209$ ), но генетическая их дифференциация была большей ( $D_{N_{cp.}} = 0,006$ ), чем между тремя исходными популяциями ( $D_{N_{cp.}} = 0,003$ ).

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* *Pinus sylvestris*, реликтовые популяции, окраска семян, аллозимная изменчивость, сопряжение.

*I.I. Korshikov<sup>1</sup>, A. M. Lisnichuk<sup>2</sup>, T.I. Velikoridko<sup>1</sup>, L.O. Kalafat<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Donetsk Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Ukraine

<sup>2</sup> Kremenets Botanical Gardens, Ternopil' Region

#### THE COUPLING OF ALLOZYMOUS VARIATION WITH THE SEEDS COLORATION OF *PINUS SYLVESTRIS* L. IN THE POPULATIONS OF KREMENETSKE HORBOHIRIYA AND MALE POLISSIA, UKRAINE

The variation coupling of the seeds coloration with the genetic features of 152 trees from three relict populations of *Pinus sylvestris* L. of Kremenetske Horbohiriya (Kremenets Hills) and Male Polissia (Lesser Polissya) was determined. The trees with motley-colored (14.3—37.3 %) and brown seeds (23.7—35.7 %) were most widespread in the populations. Five tree groups with different seeds coloration did not differ substantially by the average level of heterozygosity ( $H_o = 0.180—0.212$ ,  $H_E = 0.178—0.209$ ), but their genetic differentiation was greater ( $D_{N_{mean}} = 0.006$ ) than between the three initial populations ( $D_{N_{mean}} = 0.003$ ).

*К e y w o r d s:* *Pinus sylvestris*, relict populations, seeds coloration, allozyme variation, coupling.

