

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМА СКРЕЩИВАНИЯ СОСНЫ СТАНКЕВИЧА (*PINUS BRUTIA* VAR. *STANKEWICZII* SUKACZ.) В НЕБОЛЬШИХ ЛОКАЛИТЕТАХ СУДАКА (КРЫМ)

И.И. КОРШИКОВ, Л.А. КАЛАФАТ, Я.Г. МИЛЬЧЕВСКАЯ

Донецкий ботанический сад НАН Украины
E-mail: dbsgenetics@gmail.com

*Проведен анализ генетической изменчивости по 12 аллозимным полиморфным локусам взрослых деревьев и зародышей их семян, а также системы скрещивания в трех небольших локалитетах сосны Станкевича (*Pinus brutia* var. *stankewiczii* Sukacz.) в районе г. Судак — пгт Новый Свет в Крыму. Установлено, что у зародышей воспроизводится аллельное разнообразие растений, однако наблюдаемая гетерозиготность в среднем на 37,4 % ниже. У зародышей в 8 локусах из 12 выявлено достоверное отклонение в распределении генотипов от теоретически ожидаемого из-за недостатка гетерозигот. Многолокусная оценка доли перекрестного опыления в популяциях (t_m) варьировала от 68,9 до 94,9 %, составив в среднем 80,7 %.*

Ключевые слова: *Pinus brutia* var. *stankewiczii* Sukacz., материнские растения, зародыши семян, генетическая изменчивость, Крым.

Введение. В Крыму проходит северная граница природного распространения сосны Станкевича (*Pinus brutia* var. *stankewiczii* Sukacz.), которую относят к эндемичной расе типичного термофильного средиземноморского вида *Pinus brutia* Ten. [1]. Небольшие ее популяции встречаются в двух районах Крыма — на мысе Айя, а также между Судаким и пгт Новый Свет, однако географическая изоляция не привела к заметной генетической дифференциации этих популяций [2]. Слабая генетическая дифференциация выявлена между сосной Станкевича, сосной пицундской (*P. pithyusa* Stev.) и сосной брутской (*P. brutia* Ten.) [3]. Несмотря на то, что сосна Станкевича произрастает на территориях заказников общегосударственного значения, включая «Новый Свет», ее небольшие популяции подвергаются значительной антропогенной нагрузке вследствие дикого туризма и локальных пожаров. Все это, а также изменения климата, малочисленность и фрагментированность по-

пуляций сосны Станкевича создают реальную проблему естественного поддержания и сохранения генетического разнообразия вида в последующих поколениях. В связи с прогнозируемыми глобальными изменениями климата сохранение генетических ресурсов эндемичных малораспространенных видов будет усложняться [4]. Генетическое разнообразие небольших изолированных и фрагментированных популяций хвойных в последние годы активно исследуется для выяснения эффективного размера популяций, объема генетического груза, механизмов, ограничивающих инбредную депрессию, роли гетерозиготности в адаптивной стратегии вида [5–8]. Особое внимание уделяется системе скрещивания. В силу того, что у хвойных смешанная система скрещивания, в их популяциях всегда присутствует определенная доля инбредного потомства, формирующегося вследствие самоопыления [9, 10]. Формирование у одного дерева семян от самоопыления и перекрестного опыления рассматривают как эволюционное преимущество хвойных, которые могут его использовать, особенно на экологических пределах естественного распространения вида [5]. В небольших изолированных и фрагментированных популяциях нередко снижается численность и плотность репродуктивно активных деревьев, что реально сказывается на уровне ауткроссинга [11–13]. Следствием этого может быть повышение уровня инбридинга, снижение гетерозиготности и аллельного разнообразия в последующих поколениях. У такого потомства возрастает вероятность инбредной депрессии [14], что будет способствовать частичной потере искожных популяционно-видовых признаков, сокращению общей численности в конкретных локалитетах.

Цель работы — анализ генетической изменчивости у взрослых деревьев и зародышей их

семян, а также системы скрещивания во фрагментированной популяции сосны Станкевича в Крыму (г. Судак – пгт Новый Свет) для выяснения степени поддержания генетического разнообразия в последующем поколении в небольших по численности растений локалитетах.

Материалы и методы. Исследовали три локалитета популяции сосны Станкевича, находящихся между Судак и пгт Новый Свет в Крыму. Первый изолированный локалитет (Новый Свет-1, НС-1) – самый восточный, малочисленный (до 100 взрослых деревьев), расположен на склоне у Черного моря и подвержен значительной рекреационной нагрузке. В этом локалитете в 2011 г. найдено только 9 деревьев с шишками, в которых были полноценные семена. Локалитет Новый Свет-2 (НС-2) находится на восточном склоне горы Сокол, растения распространены на склонах до самого моря. Он значительно больше, чем локалитет НС-1 (где-то 500 деревьев). Самый крупный локалитет Новый Свет-3 (НС-3) размещается на западном склоне горы Сокол, и деревья также распространяются по склонам к морю. Локалитеты НС-2 и НС-3 подвергаются несколько меньшей рекреационной нагрузке, чем локалитет НС-1. Изучаемые выборки растений составляли: НС-1 – 9 деревьев, НС-2 – 19 деревьев, НС-3 – 23 дерева. В исследованиях генетической структуры трех локалитетов сосны Станкевича использовали 15 аллозимных локусов, а анализ генетического полиморфизма зародышей семян проводили по 12 аллозимным локусам.

Генетическими маркерами для растений и зародышей семян были изоферменты восьми ферментных систем: диафороза (DIA, К. Ф. 1.8.1.4), малатдегидрогеназа (MDH, К. Ф. 1.1.1.37), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, К. Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназа (GDH, К. Ф. 1.4.1.2), кислая фосфатаза (ACP, К. Ф. 3.1.3.2), лейцинаминопептидаза (LAP, К. Ф. 3.4.11.1), супероксиддисмутаза (SOD, К. Ф. 1.15.1.1) и форматдегидрогеназа (FDH, К. Ф. 1.2.1.2). Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из восьми и более эндоспермов и зародышей семян каждого растения, проводили в вертикальных гелевых пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля с рН 8,9 разделяющего геля в трис-глициновом электродном буфере (рН 8,3) [15]. Условия электрофоретического

разделения изоферментов и их гистохимического окрашивания, идентификация аллельных вариантов и сегрегация их у гетерозиготных деревьев сосны Станкевича, а также номенклатура локусов и аллелей описаны нами ранее [2].

Для анализа генетической изменчивости изучаемых выборок растений и зародышей семян рассчитывали частоты аллелей и генотипов, наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность, среднее число аллелей на locus (A), долю полиморфных локусов по 99%-ному критерию (P_{99}), F-статистику Райта [16]. Для анализа аллельной гетерогенности использовали стандартный χ^2 -тест [17]. Степень сходства генетических структур локалитетов анализировали с помощью коэффициента генетической дистанции Нея (D_N) [18]. Расчеты выполняли в программах BIOSYS-1 [19], GenA1EX V. 6 [20]. Оценку системы скрещивания проводили на основе анализа изменчивости десяти локусов у эндоспермов и зародышей семян изучаемых трех выборок растений, вычисляя однолокусную (t_s) и многолокусную (t_m) оценки доли перекрестного опыления с использованием программы MLTR [21].

Результаты исследований и их обсуждение. Из 15 аллозимных локусов, изученных у материнских деревьев сосны Станкевича, 13 были полиморфными, и только локусы Got-3 и Sod-4 – мономорфными. Всего выявлено 32 аллеля. При исследовании изменчивости одинакового набора из 12 локусов у материнских деревьев и зародышей семян выявлено 25 и 29 аллелей, 31 и 41 генотип соответственно. Большее аллельное и генотипическое разнообразие у зародышей связано с разными объемами выборок: количество изученных зародышей – 300, деревьев – 51.

Три исследуемых локалитета сосны Станкевича в районе г. Судак – пгт Новый Свет слабо отличались по генотипической структуре (табл. 1). В аллельной структуре деревьев существенные различия выявлены только по локусу Gdh, а в генотипической – по этому локусу и еще по двум – Fdh и Mdh-3. Выборки зародышей из этих локалитетов, наоборот, заметно различались как в аллельной, так и генотипической структуре по 8 из 12 исследуемых локусов. Подобный характер отличий в генетической структуре материнских деревьев и зародышей семян ранее

нами установлен для реликтовых популяций *Pinus sylvestris* L. Кременецкого холмогорья [22].

Несмотря на малую численность растений в локалитете НС-1, ни по одному из 12 локусов не установлено существенного отклонения в фактическом распределении генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди-Вайнберга, как и в более крупном локалитете НС-2 (табл. 2). Близкой к равновесной была генетическая структура в локалитете НС-3, так как всего по двум локусам выявлено значимое расхождение в фактическом и теоретически ожидаемом распределении генотипов. В трех выборках зародышей локусы с достоверными

отклонениями в распределении генотипов встречались значительно чаще: в локалитете НС-1 их было 3, а в НС-2 и НС-3 – соответственно 6 и 7. Существенные отклонения от равновесия Харди-Вайнберга на стадии зародышей описаны для других видов хвойных, и они не зависели от размеров их популяций [22–26]. Такое распределение генотипов у зародышей семян сосны Станкевича связано с нехваткой гетерозигот.

Средний уровень наблюдаемой (H_o) гетерозиготности у зародышей трех локалитетов оказался заметно меньше теоретически ожидаемого. Установлены высокие положительные значе-

Таблица 1. Анализ гетерогенности частот аллелей и генотипов материнских деревьев и зародышей их семян трех локалитетов сосны Станкевича в Крыму

| Локус | Аллельная структура | | Генотипическая структура | |
|-------|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Деревья | Зародыши | Деревья | Зародыши |
| Got-1 | n.s. | 16,5 (2) *** | n.s. | 12,8 (4) * |
| Got-2 | n.s. | 16,7 (2) *** | n.s. | 18,3 (4) ** |
| Gdh | 8,2 (2) * | 36,2 (4) *** | 11,2 (4) * | 35,5 (6) *** |
| Fdh | n.s. | 15,8 (2) *** | 6,2 (2) * | 16,2 (4) ** |
| Lap-1 | n.s. | 39,3 (4) *** | n.s. | 30,9 (8) *** |
| Mdh-2 | n.s. | 14,2 (4) ** | n.s. | 15,9 (6) * |
| Mdh-3 | n.s. | 6,1 (2) * | 9,9 (4)* | 14,1 (4) ** |
| Sod-1 | n.s. | 16,6 (2) *** | n.s. | 14,8 (4) ** |

Примечания. Здесь и далее: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ – отличия достоверны; n.s. – отличия недостоверны. В скобках указаны степени свободы.

Таблица 2. Анализ отклонений распределений генотипов от теоретически ожидаемых согласно закону Харди-Вайнберга в трех локалитетах сосны Станкевича в Крыму

| Локус | Новый Свет-1 | | Новый Свет-2 | | Новый Свет-3 | |
|-------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | Деревья | Зародыши | Деревья | Зародыши | Деревья | Зародыши |
| Got-1 | m | m | m | m | n.s. | 25,3 (1) *** |
| Got-2 | m | n.s. | n.s. | n.s. | 5,3 (1) * | n.s. |
| Gdh | n.s. | n.s. | n.s. | 14,8 (1) *** | n.s. | n.s. |
| Lap-1 | n.s. | 16,9 (1) *** | n.s. | 187,2 (6) *** | n.s. | 66,2 (3) *** |
| Dia-1 | m | n.s. | m | n.s. | n.s. | 40,3 (6) *** |
| Mdh-2 | n.s. | 9,1 (1) * | n.s. | 6,2 (1) * | n.s. | 18,7 (3) *** |
| Mdh-3 | n.s. | n.s. | n.s. | 40,8 (1) *** | 5,4 (1) * | 8,2 (1) ** |
| Asp | n.s. | 20,2 (3) *** | n.s. | 99,7 (3) *** | n.s. | 127,4 (3) *** |
| Sod-1 | n.s. | n.s. | n.s. | 7,1 (1) ** | n.s. | 4,3 (1) * |

Примечание. m – локус мономорфный.

ния индекса фиксации Райта — 17,5–36,0 % (табл. 3). У деревьев выявлена обратная зависимость, избыток гетерозигот составлял 3,2–24,0 %. У зародышей семян средние значения H_o были на 31,4–42,0 % меньше, нежели у деревьев. При анализе 12 локусов установлен более высокий уровень H_o у деревьев, чем при анализе 15 локусов, и это, очевидно, связано с тем, что три дополнительных локуса в отдельных локалитетах сосны Станкевича были мономорфными. В природных популяциях хвойных гетерозиготность взрослых растений часто выше, чем у зародышей семян [22, 26–29]. Более высокую гетерозиготность деревьев по сравнению с зародышами объясняют отсекающим действием отбора, который проявляется уже на первых этапах роста растений [9, 23].

Надо отметить высокий уровень гетерозиготности растений сосны Станкевича в исследуемых локалитетах ($H_o = 0,277–0,302$, $H_E = 0,251–0,267$) (табл. 3). Он заметно выше, чем у других малораспространенных видов хвойных. Так, например, в двух реликтовых популяциях *Picea martinezii* T.F. Patterson в мексиканской Сьерра-Мадре, где насчитывалось менее 800 деревьев, ожидаемая гетерозиготность составила 0,101–0,121 [30]; в 23 популяциях

Abies alba Mill. на юго-востоке Франции в Альпах средние значения H_E варьировали от 0,063 до 0,217 [31]; для популяции *Pinus maximartinezii* Rzedowski, занимающей 400 га в Мексике и насчитывающей до 2500 взрослых деревьев, значение $H_E = 0,122$ [12]; для редкой мексиканской *Pinus pinseana* во фрагментированной популяции с далеко расположенными друг от друга деревьями $H_E = 0,174$ [32]; для *Picea mexicana* Martinez, находящейся под угрозой исчезновения из-за пожаров, выпаса скота и глобального потепления, среднее значение $H_E = 0,125$ [33]; для реликтовой *Picea breweriana* Wats. в районах Калифорнии среднее значение $H_E = 0,121$ [7]. Средний уровень ожидаемой гетерозиготности сосны Станкевича в районе Судака был выше, чем у двух других более распространенных видов рода *Pinus* L. в Крыму: *Pinus pallasiana* D.Don — 0,213 и *Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch — 0,210, проанализированных по тому же набору локусов [34, 35].

Избыток гетерозигот в репродуктивной части локалитетов сосны Станкевича подтвердили и средние отрицательные значения коэффициентов F_{IS} (–0,096) и F_{IT} (–0,064), как и эксцесс гомозигот в выборке зародышей — 0,214 и 0,228 соответственно. Отличия в гене-

Таблица 3. Значения основных показателей генетического полиморфизма материнских растений и зародышей их семян в трех локалитетах сосны Станкевича в Крыму

| Выборка | Количество | | Доля полиморфных локусов, P_{99} | Среднее число аллелей, A | Средняя гетерозиготность, $M \pm m$ | | Индекс фиксации Райта, F |
|------------------------------|------------|----------------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------------|
| | локусов | деревьев и зародышей | | | ожидаемая, H_E | наблюдаемая, H_o | |
| Новый Свет-1 деревья | 15 | 9 | 0,667 | 1,733 | $0,233 \pm 0,032$ | $0,289 \pm 0,032$ | –0,240 |
| | 12 | | 0,667 | 1,750 | $0,254 \pm 0,037$ | $0,315 \pm 0,037$ | –0,240 |
| зародыши | 12 | 52 | 0,833 | 2,083 | $0,262 \pm 0,016$ | $0,216 \pm 0,015$ | 0,175 |
| Новый Свет-2 деревья | 15 | 19 | 0,600 | 1,800 | $0,245 \pm 0,022$ | $0,253 \pm 0,022$ | –0,033 |
| | 12 | | 0,583 | 1,750 | $0,246 \pm 0,025$ | $0,254 \pm 0,024$ | –0,032 |
| зародыши | 12 | 114 | 0,750 | 2,000 | $0,261 \pm 0,011$ | $0,167 \pm 0,009$ | 0,360 |
| Новый Свет-3 деревья | 15 | 23 | 0,800 | 2,000 | $0,246 \pm 0,021$ | $0,293 \pm 0,021$ | –0,191 |
| | 12 | | 0,833 | 2,083 | $0,274 \pm 0,025$ | $0,337 \pm 0,024$ | –0,229 |
| зародыши | 12 | 134 | 0,833 | 2,333 | $0,263 \pm 0,010$ | $0,198 \pm 0,009$ | 0,247 |
| Всего и в среднем деревья | 15 | 51 | 0,800 | 2,133 | $0,251 \pm 0,014$ | $0,277 \pm 0,014$ | –0,104 |
| | 12 | | 0,833 | 2,083 | $0,267 \pm 0,016$ | $0,302 \pm 0,016$ | –0,131 |
| зародыши | 12 | 300 | 0,833 | 2,417 | $0,268 \pm 0,007$ | $0,189 \pm 0,006$ | 0,295 |

тической структуре локалитетов были несколько выше, чем у выборок зародышей семян, о чем свидетельствуют средние значения коэффициентов F_{ST} , соответственно 0,029 и 0,018. Дифференциация трех выборок материнских деревьев и выборок зародышей была, судя по значениям коэффициента генетической дистанции Нея (D_N), незначительной – 0,017 и 0,015, что свидетельствует об общности происхождения этих древостоев. У сильно фрагментированной *Picea breweriana* среднее значение F_{ST} составило 0,152, что намного выше, чем у многих широко распространенных видов хвойных [7]. Большой дифференциацией отличалась находящаяся под угрозой исчезновения на высокогорьях *Picea mexicana* – $F_{ST} = 0,069$ [33].

Дополнительным элементом анализа генетической структуры популяции сосны Станкевича является распределение гетерозигот в ее взрослой части и семенном потомстве. В исследуемой популяции преимущественно представлены деревья, в генотипах которых имеется от 3 до 5 гетерозиготных локусов (табл. 4). Количество таких деревьев составило 72,5 % от общего исследуемого их числа. Среди зародышей семян в большей степени представлены генотипы с 1–3 гетерозиготными локусами, их доля составила 76,0 %. Генотипов с 3–5 гетерозиготными локусами среди зародышей было 35,7 %, что в два раза меньше, нежели у материнских растений. Следовательно, для под-

держания генетической структуры популяции значительное количество зародышей семян в процессе последующего онтогенетического развития должно отсекается естественным отбором. Наблюдаемая средняя гетерозиготность зародышей семян в классах материнских деревьев, которые поделены в зависимости от количества гетерозиготных локусов в их генотипе, была меньшей, за исключением первого класса деревьев с одним гетерозиготным локусом. Высокогетерозиготные деревья (4–7 локусов) продуцировали семена, гетерозиготность зародышей которых была в 1,8–2,1 раза меньше. Можно констатировать, что снижение среднего уровня гетерозиготности у зародышей происходит в первую очередь за счет высокогетерозиготных деревьев исследуемых локалитетов. Для зародышей семян всех выделенных классов деревьев по уровню гетерозиготности характерен эксцесс гомозигот от 4,0 до 31,4 %. Следовательно, в субоптимальных условиях среды баланс между инбридингом и аутбридингом в популяции сосны Станкевича в большей степени нарушают высокогетерозиготные деревья. С позиций концепции генетического оптимума адаптации, рассматриваемой как компромисс между индивидуальной и популяционной составляющей [16], количество выщепленных генотипов на онтогенетических стадиях семенного потомства у деревьев с разным уровнем гетерозиготности будет неодинаковым. Это по-

Таблица 4. Распределение количества зародышей и их средней гетерозиготности в зависимости от количества полиморфных локусов у материнских растений объединенной выборки популяции сосны Станкевича в Крыму

| Число гетерозиготных локусов | Дере- вья * | Распределение зародышей по числу гетерозиготных локусов | | | | | | | | | | Зароды- ши ** | Гетерозиготность | | F |
|------------------------------|----------------|---|----|-----|----|----|----|---|---|---|-----------------------|------------------|---------------------|-------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | наблюдаемая, H_o | | ожидаемая, H_e | | |
| 1 (0,083) | 5 | 6 | 8 | 11 | 2 | 2 | – | – | – | – | 29 | 0,126 ± 0,024 | 0,173 ± 0,026 | 0,272 | |
| 2 (0,167) | 5 | 2 | 10 | 10 | 4 | 2 | 1 | – | – | – | 29 | 0,158 ± 0,023 | 0,209 ± 0,030 | 0,244 | |
| 3 (0,250) | 15 | 5 | 24 | 33 | 14 | 11 | 3 | – | – | – | 90 | 0,177 ± 0,026 | 0,258 ± 0,025 | 0,314 | |
| 4 (0,333) | 10 | 4 | 12 | 22 | 14 | 3 | 3 | 1 | – | – | 59 | 0,185 ± 0,023 | 0,244 ± 0,026 | 0,242 | |
| 5 (0,417) | 12 | 2 | 13 | 17 | 20 | 12 | 6 | 1 | – | – | 72 | 0,230 ± 0,026 | 0,300 ± 0,027 | 0,233 | |
| 6 (0,500) | 3 | – | – | 8 | 3 | 5 | – | – | – | 1 | 16 | 0,234 ± 0,032 | 0,298 ± 0,030 | 0,215 | |
| 7 (0,583) | 1 | – | 1 | 1 | 1 | 1 | – | – | 1 | – | 5 | 0,283 ± 0,040 | 0,295 ± 0,028 | 0,040 | |
| Всего | 51 | 19 | 68 | 102 | 58 | 36 | 13 | 2 | 1 | 1 | 300 | 0,199 ± 0,010 | 0,254 ± 0,011 | 0,248 | |

Примечание. F – индекс фиксации Райта. * Количество материнских деревьев. ** Количество зародышей (общее).

ложение, требующее дополнительных исследований, важно при подборе деревьев-семенников для искусственного размножения сосны Станкевича.

Пониженный уровень гетерозиготности зародышей семян хвойных по сравнению с материнскими растениями связывают с самоопылением, а также с существованием микродифференциации или семейной структуры внутри популяций [9, 10, 36]. Для изучаемых локалитетов сосны Станкевича характерен, как правило, невысокий уровень перекрестного опыления. Так, например, согласно однолокусной оценке (t_s) доля перекрестного опыления в локалитетах варьирует от 50,5 до 78,1 %, составив в среднем 62,3 % (табл. 5). Несколько большими были эти значения при использовании многолокусной оценки (t_m): 68,9–94,9 %, в среднем 81 %. Это свидетельствует о семейной структуре исследуемых локалитетов и ее вкладе в инбридинг. Высокий уровень перекрестного опыления (94,9 %), выявленный в малочисленном локалитете НС-1, который располагается на склоне возле моря, можно объяснить расположенностью растений на крутом склоне: женские шишки с семяпочками размещаются, как правило, в верхней части кроны растений, «контактируя» с мужскими репродуктивными органами вышестоящих соседних деревьев, поскольку стробилы расположены чаще в нижней части их кроны. В результате такого расположения репродуктивных органов у растений при дуновении ветра пыльце проще попасть на семяпочки соседнего дерева, чем на свои. Этому могли также способствовать восходящие потоки воздуха.

В целом интенсивность попадания пыльцы на семяпочки растений от соседних деревьев во многом зависит от погодных условий: силы

ветра, его направленности, влажности воздуха, интенсивности осадков [9].

У ветроопыляемых видов доля самоопыления обычно отрицательно коррелирует с высокой численностью и плотностью растений в популяции. Как показано на примере *Picea sitchensis*, узколокально произрастающей на тихоокеанском побережье Северной Америки, количество доноров пыльцы в пять раз выше, а самоопыление в 4,8 раза ниже в популяциях центральной части ареала, чем в северных географически изолированных популяциях [13]. У *Abies alba* снижение плотности популяций, особенно на краевых участках, привело к уменьшению доли перекрестного опыления (t_m) в два раза – от 0,87 до 0,43 [5]. Очевидно, репродуктивное обеспечение растений (пыльцевой режим) и предотвращение инбридинга может зависеть от плотности популяции. В популяции *Pinus sylvestris* с низкой плотностью увеличивалась доля семян от самоопыления, а также возрастало количество пустых семян [37]. В изреженных популяциях снижается потенциал для формирования ауткроссных семян и смещается в невыгодную сторону баланс затрат на формирование семян вследствие самоопыления. В таких популяциях уменьшается численность пригодного партнера на репродуктивность [5, 32, 37]. На границе ареала вида из-за высокой варибельности уровня плотности внутри популяций изменяется и общий уровень самоопыления, характерный в целом для вида [5].

Локалитеты сосны Станкевича по причине высокой гетерогенности рельефа местности, а также антропогенного влияния за прошедшие годы имеют участки разной плотности и численности. Соответственно количество пыльцы, образуемой растениями разных по плотности участков, неодинаковое и может быть реша-

Таблица 5. Доля перекрестного опыления в трех локалитетах сосны Станкевича в Крыму

| Выборка | Количество изученных зародышей | Доля перекрестного опыления | | Коэффициент инбридинга | |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------|------------------|
| | | t_s | t_m | ожидаемый, F_e | фактический, F |
| Новый Свет-1 | 52 | 0,781 ± 0,068 | 0,949 ± 0,064 | 0,026 | 0,175 |
| Новый Свет-2 | 114 | 0,505 ± 0,064 | 0,689 ± 0,066 | 0,184 | 0,360 |
| Новый Свет-3 | 134 | 0,582 ± 0,042 | 0,784 ± 0,066 | 0,121 | 0,247 |
| В среднем | 300 | 0,623 ± 0,058 | 0,807 ± 0,065 | 0,107 | 0,261 |

ющим фактором в практической реализации системы скрещивания. Древостои с невысокой плотностью могут иметь низкий уровень ауткроссинга, потому что пыльца материнских растений меньше разбавляется пылью от соседних деревьев. Семена, взятые из краевого древостоя *Abies alba* с низкой плотностью, хуже прорастали (доля проросших семян составила 32 %), чем семена из зрелого древостоя с высокой плотностью (53 %). Несмотря на то, что древостои *Abies alba* с невысокой плотностью продуцируют больше инбредного потомства и пустых семян, выживаемость их после четырех лет выращивания в питомниках выше, чем у семян из древостоев с высокой плотностью, особенно в стрессовых условиях недостаточного увлажнения [5].

Таким образом, можно констатировать, что сосна Станкевича в районе г. Судака – пгт Новый Свет отличается высоким уровнем генетической изменчивости. В семенном потомстве небольших локалитетов этой популяции сохраняется аллельное, однако явно снижается генотипическое разнообразие в сравнении с материнскими растениями. Связано это с тем, что около 20 % семян формируются в результате самоопыления растений. В этих популяциях редко встречаются молодые растения, и в годы наших наблюдений практически отсутствовало семенное возобновление. Это может быть связано как с неблагоприятными климатическими условиями (длительные засухи в период вегетации), так и вытаптыванием молодых растений туристами. Высокая антропогенная нагрузка на сосну Станкевича в районе г. Судака – пгт Новый Свет может привести к нарушениям нативной структуры популяций и за счет преждевременной элиминации старших возрастных групп растений. В этих популяциях встречаются усохшие старовозрастные растения. С учетом всего этого и высокой доли инбредного семенного потомства в этом районе создаются реальные угрозы поддержания эволюционно сформированного генетического разнообразия небольших локалитетов и в целом популяции сосны Станкевича в последующих поколениях. Высокий уровень гетерозиготности материнских растений и варьирование доли перекрестного опыления в локалитетах сосны Станкевича могут быть компо-

нентами адаптивной стратегии этого вида на пределе естественного распространения, позволяющими восстанавливать генетическое разнообразие вида при снятии стрессовых нагрузок.

GENETIC DIVERSITY AND MATING SYSTEM
PINUS BRUTIA VAR. *STANKEWICZII* SUKACZ.
IN SMALL LOCALITIES OF SUDAK (CRIMEA)

I.I. Korshikov, L.A. Kalafat, Ya.G. Milchevskaya

Donetsk Botanical Garden of the NAS of Ukraine
E-mail: dbsgenetics@gmail.com

A comparative analysis of genetic variation at 12 polymorphic isozyme loci, and the mating system has been carried out in mature trees and their seed progeny in three small localities of *Pinus brutia* var. *stankewiczii* Sukacz. near the town of Sudak – settlement of Novyi Svet in the Crimea. We found that embryos maintain the same allelic diversity as mother plants but their observed heterozygosity is lower on the average by 37,4 %. The significant deviation of genotype distribution from the theoretically expected ratios caused by the deficiency of heterozygotes was observed at 8 out of 12 loci. Multilocus estimate of outcrossing rate (t_m) in populations varied from 68,9 to 94,9 % making on the average 80,7 %.

ГЕНЕТИЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ
І СИСТЕМА СХРЕЩУВАННЯ СОСНИ
СТАНКЕВИЧА (*PINUS BRUTIA* VAR.
STANKEWICZII SUKACZ.) У НЕВЕЛИКИХ
ЛОКАЛІТЕТАХ СУДАКА (КРИМ)

I.I. Коршиков, Л.О. Калафат, Я.Г. Мільчевська

Проведено аналіз генетичної мінливості за 12 алозимними поліморфними локусами дорослих дерев і зародків їхнього насіння, а також системи схрещування у трьох невеликих локалітетах сосни Станкевича (*Pinus brutia* var. *stankewiczii* Sukacz.) в районі м. Судака – смт Новий Світ у Криму. Встановлено, що у зародків відтворюється алейна різноманітність рослин, однак наявна гетерозиготність у середньому на 37,4 % нижча. У зародків за 8 локусами з 12 виявлено достовірне відхилення в розподілі генотипів від теоретично очікуваного через нестачу гетерозигот. Багатолокусна оцінка частки перехресного запилення в популяціях (t_m) варіювала від 68,9 до 94,9 %, склавши у середньому 80,7 %.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дідух Я.П., Плюта П.Г., Протопопова В.В. та ін. Екофлора України. Т. 1 / Відп. ред. Я.П. Дідух. – К.: Фітосоціоцентр, 2000. – 284 с.
2. Korshikov I.I., Gorlova E.M. Genetic structure, subdivision, and differentiation in Stankewiczii pine

- (*Pinus stankewiczii* (Sukacz.) Fomin) populations from Mountainous Crimea // Rus. J. Genet. – 2006. – 42, № 6. – P. 672–680.
3. Гончаренко Г.Г., Болсун С.И., Нево Э., Захави А. Генетико-таксономические взаимоотношения у сосны пицундской, сосны Станкевича и сосны брутской // Докл. РАН. – 1998. – 359, № 4. – С. 565–568.
 4. Ledig F.T. Climate change and conservation // Acta Silv. Lign. Hung. – 2012. – 8. – P. 57–74.
 5. Restoux G., Silva D.E., Sagnard F. et al. Life at the margin: the mating system of Mediterranean conifers // Web Ecol. – 2008. – 8. – P. 94–102.
 6. O'Connell L.M., Mosseler A., Rajora O.P. Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level // Heredity. – 2006. – 97. – P. 418–426.
 7. Ledig F.T., Hodgskiss P.D., Johnson D.R. Genic diversity, genetic structure, and mating system of Brewer spruce (Pinaceae), a relict of the Arcto-Tertiary forest // Amer. J. Bot. – 2005. – 92, № 12. – P. 1975–1986.
 8. Bower A.D., Aitken S.N. Mating system and inbreeding depression in whitebark pine (*Pinus albicaulis* Engelm.) // Tree Genet. Genom. – 2007. – 3, № 4. – P. 379–388.
 9. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.
 10. Lewandowski A., Burczyk J. Mating system and genetic diversity in natural populations of European larch (*Larix decidua*) and Stone pine (*Pinus cembra*) located at higher elevations // Silvae Genet. – 2000. – 49, № 3. – P. 158–161.
 11. De-Lucas A.I., Robledo-Arnuncio J.J., Hidalgo E., González-Martínez S.C. Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine // Heredity. – 2008. – 100. – P. 390–399.
 12. Ledig F.T., Conkle M.T., Bermejo-Velazquez B. et al. Evidence for an extreme bottleneck in a rare Mexican pinyon: genetic diversity, disequilibrium and the mating system in *Pinus maximartinezii* // Evolution. – 1999. – 53. – P. 91–99.
 13. Mimura M., Aitken S.N. Increased selfing and decreased effective pollen donor number in peripheral relative to central populations in *Picea sitchensis* (Pinaceae) // Amer. J. Bot. – 2007. – 94, № 6. – P. 991–998.
 14. Sorensen F.C., Campbell P.K. Near neighbor pollination and plant vigor in coastal Douglas-fir // Forest Genet. – 1997. – 4, № 3. – P. 149–158.
 15. Davis B.J. Disk electrophoresis. 2. Methods and application to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – 121. – P. 404–427.
 16. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – М.: ИКЦ Академкнига, 2003. – 431 с.
 17. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М.: Наука, 1991. – 271 с.
 18. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. – 1972. – 106. – P. 283–292.
 19. 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, № 4. – P. 281–283.
 20. Peakall R., Smouse P.E. GenAlexV 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – 6. – P. 288–295.
 21. Ritland K. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci // Heredity. – 2002. – 88. – P. 221–228.
 22. Korshikov I.I., Kalafat L.A., Lisnichuk A.N. et al. Allozyme variation of seed embryos and mating system in relict populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Kremenets Hill ridge and Maloe Poles'e // Rus. J. Genet. – 2011. – 47, № 7. – P. 829–835.
 23. Muona O., Yazdani R., Rudin D. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris*: Allozyme variation in seeds and planted seedlings // Rus. J. Genet. – 1987. – 36, № 1. – P. 39–42.
 24. Shaw D.V., Allard R.W. Isozyme heterozygosity in adult and open-pollinated embryo samples of Douglas-fir // Silva Fenn. – 1982. – 16, № 2. – P. 115–121.
 25. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. Pinaceae) северной Евразии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2007. – 47 с.
 26. Fins L., Libby W.L. Population variation in *Sequoiadendron*: seed and seedling studies vegetative propagation and isozyme variation // Silvae Genet. – 1982. – 31, № 4. – P. 102–110.
 27. Korshikov I.I., Pirko N.N., Mudrik E.A., Pirko Ya.V. Maintenance of genetic structure in progenies of marginal mountainous and steppe populations of three species of *Pinaceae* Lindl. family in Ukraine // Silvae Genet. – 2007. – 56, № 1. – P. 1–10.
 28. El-Kassaby Y.A., Meagher M.D., Parkinson J., Portlock F.T. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia // Heredity. – 1987. – 38, № 1. – P. 173–181.
 29. Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Политов Д.В. Система скрещивания и динамика аллозимной гетерогенности в популяциях кедрового стланика *Pinus pumila* (Pall.) Regel. // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – 27, № 1/2. – С. 13–17.
 30. Ledig F.T., Bermejo-Velázquez B., Hodgskiss P.D. et al. The mating system and genic diversity in Martínez spruce, an extremely rare endemic of México's Sierra

- Madre Oriental: an example of facultative selfing and survival in interglacial refugia // *Can. J. Forest Res.* – 2000. – 3, № 7. – P. 1156–1164.
31. Fady B., Forest I., Hochu I. et al. Genetic differentiation in *Abies alba* Mill. populations from southeastern France // *Forest Genet.* – 1999. – 6, № 3. – P. 129–138.
32. Ledig F.T., Capo-Arteaga M.A., Hodgskiss P.D. et al. Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican pinon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae) // *Amer. J. Bot.* – 2000. – 88. – P. 1977–1987.
33. Ledig F.T., Hodgskiss P.D., Jacob-Cervantes V. Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martinez // *Conserv. Genet.* – 2002. – 3. – P. 113–122.
34. Коршиков И.И. Популяционная генетика и репродуктивная биология сосны крымской. – Донецк, 2010. – 244 с.
35. Коршиков И.И., Подгорный Д.Ю., Калафат Л.А., Великоридько Т.И. Популяционно-генетическая изменчивость сосны Коха (*Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch) в Горном Крыму // *Доп. НАН України.* – 2010. – № 5. – С. 161–167.
36. Allard R.W., Epperson B.K. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within population of Longepole pine // *Genetics.* – 1989. – 121, № 2. – P. 369–377.
37. Robledo-Arnuncio J.J., Alia R., Gil L. Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris* // *Mol. Ecol.* – 2004. – 13, № 9. – P. 2567–2577.

Поступила 10.06.13