

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

<sup>1</sup>Донецький ботанічний сад НАН України  
Пр. Ілліча, 110, Донецьк, 83059, Україна  
herb@herb.dn.ua

<sup>2</sup>Кременецький ботанічний сад  
Вул. Ботанічна, 5, Кременець, Тернопільська обл., 47003,  
Україна

## АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ РЕЛІКТОВИХ ПОПУЛЯЦІЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. І *PINUS SYLVESTRIS* var *CRETACEA* KALENICZ. ex KOM. В УКРАЇНІ

---

*Ключові слова:* *Pinus sylvestris*, *P. sylvestris* var. *cretacea*,  
реліктові популяції, генетична структура, підрозділеність,  
диференціація

Генетико-таксономічний підхід у з'ясуванні суперечливих питань систематики та еволюційної філогенії рослин останніми роками набуває вирішального значення [12—15]. До точних геносистематичних методів належить порівняльний аналіз популяційної мінливості алозимів досліджуваних видів, який є особливо ефективним для вивчення хвойних [3, 4, 9, 11]. Визначивши частоти алелів (генів) одних і тих самих локусів у популяціях порівнюваних видів, за допомогою статистичних методів можна встановити ступінь подібності або спорідненості видів. Найбільш уніфікованим статистичним критерієм для цього є генетична дистанція М. Нея [17], яка широко застосовується у подібних дослідженнях [3, 4, 9, 11—15]. Саме за допомогою згаданих аналітичного та статистичних методів ми раніше визначили ступінь розбіжності та подібності *Pinus sylvestris* L. і *P. sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. у межах їх спільного ареалу, що знаходиться в середній частині течії р. Сіверський Донець [7]. Ці та інші дослідження [3, 4] засвідчують, що *P. sylvestris* var. *cretacea* не є окремим видом. Слід зазначити, що раніше вивчені нами популяції *P. sylvestris* [7] не є реліктовими та походять від мегапопуляції, ареал якої на Південному Сході України неодноразово змінювався під час льодовикового та післяльодовикового періодів і зазнав інсуляризації [1, 10]. Мабуть, внаслідок міграції, естафетної передачі генів, інтрогресії з іншими формами генетична структура популяцій *P. sylvestris* у цьому районі суттєво відрізняється від такої реліктових популяцій даного виду в Українських Карпатах [8]. Тому для точнішого визначення генетико-таксономічних зв'язків *P. sylvestris* та *P. sylvestris* var. *cretacea* важливо порівняти генетичну структуру їх реліктових популяцій. Найбільш цікавим об'єктом для такого

аналізу є реліктові популяції *P. sylvestris* на дерново-карбонатних ґрунтах Кременецького горбогір'я [2].

Мета роботи — аналіз генетичної спорідненості реліктових популяцій *P. sylvestris* і *P. sylvestris* var. *cretacea*, включаючи оцінку генетичної гетерогенності їх насінневого потомства та пулу батьківських гамет на основі даних алозимної мінливості.

### Матеріал і методи дослідження

Об'єктами досліджень були реліктова популяція *P. sylvestris* на дерново-карбонатних ґрунтах східної частини Кременецького горбогір'я (територія лісового заказника «Суразька дача» (СД), Тернопільська обл.) та дві реліктові субпопуляції (БР1 і БР2) *P. sylvestris* var. *cretacea* на крейдяних відслоненнях правого берега р. Сіверський Донець, розташовані на території національного природного парку «Святі гори» у Донецькій обл. У цих популяціях ми зібрали насіння з 22—29 найстаріших за віком (100 і більше років) дерев для електрофоретичного аналізу ізоферментів у поліакріламідному гелі [16]. Генетичними маркерами були ізоферменти дев'яти ферментних систем для визначення генотипів рослин і п'яти — для зародків насіння. Для електрофоретичного аналізу використовували не менше восьми насінин з кожного дерева. Методика екстракції ферментів, їх електрофоретичного розділення, гістохімічного забарвлення, номенклатури локусів та алелів детально викладена у наших попередніх працях, присвячених *P. sylvestris* [7, 8]. Ступінь генетичної подібності або розбіжності популяцій встановлювали за традиційними популяційно-генетичними показниками [18]. Генетичну дистанцію розраховували за М. Неєм [17]. Гетерогенність частот алелів та генотипів оцінювали за стандартним  $\chi^2$ -тестом [6].

### Результати досліджень та їх обговорення

Електрофоретичний аналіз 9 ферментних систем у вибірках материнських рослин дав змогу з'ясувати мінливість 19 алозимних локусів, з яких у популяціях обох таксонів 15 були поліморфними, а 4 — мономорфними (Sod-1, Sod-2, Sod-3, Sod-4). У вибірках зародків насіння *P. sylvestris* з 10 локусів поліморфними були 9 (мономорфний Sod-4), *P. sylvestris* var. *cretacea* — 8 (мономорфні Sod-4 і Got-1). У загальній вибірці рослин *P. sylvestris* var. *cretacea* встановлено 43 алеля 19 локусів, *P. sylvestris* — 40, спільними були 38 алелів. У вибірках зародків насіння за 10 локусами описано 26 і 28 алелів *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris*, відповідно, спільні — 22 алеля. За середнім числом алелів і генотипів на локус, часткою поліморфних локусів вибірки материнських рослин та зародків насіння реліктових популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* мають близькі значення (табл. 1).

Середня наявна гетерозиготність ( $H_O$ ) дерев у популяції *P. sylvestris* var. *cretacea* за 19 та 10 алозимними локусами несуттєво менша, ніж у популяціях *P. sylvestris* на дерново-карбонатних ґрунтах (див. табл. 1). Рівень наяв-

Таблиця 1. Значення основних показників генетичного поліморфізму материнських рослин та зародків їх насіння реліктових популяцій *Pinus sylvestris* і *P. sylvestris* var. *cretacea* в Україні

Вибірка	Об'єм вибірки, шт.	Кількість локусів	Частка поліморфних локусів ( $P_{99}$ )	Середнє число алелів на локус	Середнє число генотипів на локус	Середня гетерозиготність		Індекс фіксації Райта (F)
						очікувана ( $H_E$ )	наявна ( $H_O$ )	
Mr	29	19	0,789	2,158	2,526	0,203±0,015	0,203±0,015	0
Mr	29	10	0,900	2,400	2,900	0,266±0,023	0,266±0,023	0
Зн	232	10	0,800	2,500	3,700	0,259±0,008	0,151±0,007	0,417
<i>Pinus sylvestris</i>								
БР1, Mr	22	19	0,684	2,105	2,421	0,181±0,018	0,178±0,018	0,017
БР2, Mr	24	19	0,737	2,158	2,631	0,197±0,023	0,196±0,017	0,005
Mr	24	10	0,800	2,400	2,900	0,233±0,026	0,225±0,025	0,035
Зн	192	10	0,800	2,500	3,800	0,229±0,009	0,183±0,008	0,201
<i>Pinus sylvestris</i> var. <i>cretacea</i>								

Примітка: тут і в таблицях 2, 3 — БР1 і БР2 — субпопуляції *P. sylvestris* var. *cretacea*, Mr — материнські рослини, Зн — зародки насіння.

Таблиця 2. Гетерогенність алелів та генотипів материнських рослин і зародків їх насіння, алельна гетерогенність пулу батьківських гамет у реліктових популяціях *Pinus sylvestris* і *P. sylvestris* var. *cretacea* в Україні за 15 поліморфними локусами

Локус	Мр		Зн		
	А	Г	А	Г	Бг
Gdh	7,12**(1)	8,39*(3)	31,90***(2)	36,28***(3)	6,67*(2)
Got-1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Got-2	n.s.	n.s.	n.s.	21,96***(2)	n.s.
Got-3	16,05***(2)	17,55***(4)	152,17***(2)	96,81***(5)	55,85***(2)
Mdh-2	6,69***(1)	n.s.	48,33***(2)	43,35***(2)	18,96***(1)
Mdh-3	n.s.	n.s.	8,57*(2)	n.s.	n.s.
Acp	n.s.	n.s.	17,25***(4)	n.s.	15,35***(4)
Lap-1	n.s.	n.s.	n.s.	11,32*(5)	8,97*(3)
Lap-2	n.s.	n.s.	n.s.	11,11*(3)	n.s.
Dia-1	9,85***(2)	n.s.	—	—	—
Dia-2	n.s.	13,32*(6)	—	—	—
Dia-4	21,26***(4)	24,36***(4)	—	—	—
Adh-1	n.s.	n.s.	—	—	—
Adh-2	n.s.	n.s.	—	—	—
Fdh	n.s.	n.s.	—	—	—

Примітки. А — алелі, Г — генотипи, Бг — пул батьківських гамет; у дужках наведено числа ступенів свободи, \* $P_{0,05}$ , \*\* $P_{0,01}$ , \*\*\* $P_{0,001}$ , n.s. — різниця несуттєва.

ної гетерозиготності *P. sylvestris* var. *cretacea* порівняно з суміжними популяціями *P. sylvestris* на Південному Сході України був достовірно нижчим ( $H_0$   $0,218 \pm 0,010$  і  $0,250 \pm 0,006$ , відповідно) [7]. Значення індексу фіксації Райта та аналіз генотипічного розподілу за законом Харді—Вайнберга вказують, що вибірки дерев обох популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* у цілому відповідають рівноважному співвідношенню гомо- та гетерозиготних генотипів. У вибірках зародків насіння обох таксонів середній рівень  $H_0$  достовірно нижчий, ніж у материнських дерев, що загалом властиво популяціям хвойних та пов'язано з високим рівнем самозапилення рослин [5]. При цьому насінневе потомство популяції *P. sylvestris* характеризується меншою кількістю гетерозигот (41,7 %) порівняно з *P. sylvestris* var. *cretacea* (20,1 %).

Частоти алелів дерев порівнюваних популяцій достовірно гетерогенні за 5 з 15 поліморфних локусів, частоти генотипів — за 4 (табл. 2), тоді як суттєва алельна та генотипічна гетерогенність реліктових популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і популяцій *P. sylvestris* у їх спільному ареалі встановлена за 15 з 19 поліморфних локусів [7]. Насінневе потомство реліктових популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* відтворює неоднорідність алелів та генотипів материнських рослин, але випадків суттєвої гетерогенності у вибірках зародків більше, ніж у дерев, що пояснюється розбіжністю у складі та часто-

Таблиця 3. Значення показників міжпопуляційної диференціації  $F_{ST}$  і  $G_{ST}$  [18] материнських рослин та зародків їх насіння популяцій *Pinus sylvestris* і *P. sylvestris* var. *cretacea* в Україні

Локус	Реліктові популяції <i>P. sylvestris</i> і <i>P. sylvestris</i> var. <i>cretacea</i>				Реліктові популяції <i>P. sylvestris</i> var. <i>cretacea</i> та суміжні з ними популяції <i>P. sylvestris</i>	
	$F_{ST}$		$G_{ST}$		$F_{ST}$	$G_{ST}$
	Мр	Зс	Мр	Зс		
Gdh	0,083	0,024	0,083	0,034	0,045	0,045
Got-1	0,010	0,004	0,010	0,004	0,012	0,011
Got-2	0,009	0,004	0,009	0,004	0,025	0,024
Got-3	0,085	0,118	0,111	0,171	0,041	0,045
Sod-4	0	0	0	0	0,017	0,017
Mdh-2	0,041	0,057	0,041	0,057	0,044	0,044
Mdh-3	0,013	0,004	0,015	0,001	0,033	0,043
Asp	0,015	0,006	0,016	0,009	0,055	0,054
Lap-1	0,005	0,004	0,004	0,003	0,034	0,037
Lap-2	0,036	0,003	0,020	0,005	0,037	0,024
Dia-1	0,065	—	0,065	—	0,054	0,044
Dia-2	0,026	—	0,028	—	0,028	0,031
Dia-4	0,062	—	0,058	—	0,035	0,033
Adh-1	0,019	—	0,020	—	0,038	0,040
Adh-2	0,027	—	0,031	—	0,041	0,045
Fdh	0,007	—	0,003	—	0,044	0,055
Середнє	0,026	0,022	0,027	0,029	0,031	0,031

тах їхніх алелів і генотипів. Крім того, за 5 з 9 поліморфних локусів встановлена суттєва неоднорідність пулів батьківських гамет, котрі сформували насінневе потомство популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris*.

Середні значення коефіцієнтів  $F_{ST}$  і  $G_{ST}$ , що характеризують підрозділеність популяцій [18], дуже близькі для реліктових популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* та реліктових *P. sylvestris* var. *cretacea* і суміжних з ними популяцій *P. sylvestris* (табл. 3). Це свідчить на користь того, що сучасні популяції *P. sylvestris* зберігають вихідний рівень міжпопуляційних генетичних розбіжностей з реліктовою популяцією *P. sylvestris* var. *cretacea*, який є відносно невисоким (у середньому для 22 видів хвойних  $G_{ST} = 0,059$  [9]). Але слід зазначити, що практично однакова генетична підрозділеність порівнюваних у цій та попередній [7] працях популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* зумовлена внеском різних локусів. Лише за локусами Mdh-2, Lap-2, Dia-1, Dia-2, Adh-2 значення  $F_{ST}/G_{ST}$  близькі в обох порівнювальних популяціях *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris*, у той час як зіставляючи виключно реліктові популяції за локусами Asp, Lap-1, Adh-1, Fdh значення  $F_{ST}/G_{ST}$  у кілька разів менші, а за локусами Gdh, Got-3, Dia-4 — більші, ніж між реліктовими-

ми *P. sylvestris* var. *cretacea* та суміжних з ними популяціями *P. sylvestris* (див. табл. 3). Вірогідно, така дисперсія полокусних значень  $F_{ST}/G_{ST}$  відображає особливості еволюції генетичної структури популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* упродовж льодовикового та післяльодовикового періодів. Рівень міжпопуляційної підрозділеності насінневого потомства зберігається на тому ж рівні, що й у вибірках дерев досліджуваних реліктових популяцій.

Генетична дистанція Нея ( $D_N$ ), яка враховує всі розбіжності аельних частот порівнюваних популяцій [17] за 19 локусами, для популяцій *P. cretacea* і *P. sylvestris* становить 0,016—0,022, що виявилось близьким до середнього значення  $D_N$ , визначеного у нашій попередній праці (0,020) [7] та під час порівняння популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* з України та Росії, а також *P. sylvestris* Східної Європи і Сибіру (0,018) [4]. Генетична дистанція між вибірками зародків насіння реліктових популяцій *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris* за 10 локусами така сама, що й у материнських рослин (0,029). Встановлені невеликі генетичні розбіжності між реліктовими популяціями *P. sylvestris* var. *cretacea* і *P. sylvestris*, що зростають на дерново-карбонатних ґрунтах, ще раз свідчать про невидовий статус *P. sylvestris* var. *cretacea* [3, 4, 7].

Таким чином, віддалені одна від одної реліктові популяції *P. sylvestris* var. *cretacea* Донбасу та *P. sylvestris* Кременецького горбогір'я знаходяться у більшій генетичній близькості, ніж популяції *P. sylvestris* var. *cretacea* та *P. sylvestris* у їх спільному ареалі на Південному Сході України [7]. Мабуть, у басейні р. Сіверський Донець популяції *P. sylvestris* упродовж еволюції мали значно більші можливості для обміну генами внаслідок змін меж свого ареалу, ніж ізольовані реліктові популяції *P. sylvestris* і *P. sylvestris* var. *cretacea*. При цьому у популяціях *P. sylvestris* у межах пульсуючого ареалу еволюційних змін зазнали не всі, а лише деякі гени, що збільшило їх генетичну розбіжність з популяціями *P. sylvestris* var. *cretacea* у Донбасі.

1. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. — Л.: Наука, 1978. — 189 с.
2. Геоботаничне районування Української РСР. — К.: Наук. думка, 1977. — 302 с.
3. Гончаренко Г.Г. Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики. — Минск: Тэхнолѳія, 1999. — 188 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—2038.
5. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. — М.: Наука, 2004. — 619 с.
6. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. — М.: Наука, 1991. — 271 с.
7. Коршиков И.И., Калафат Л.А., Тунда С.Н., Великоридько Т.И. Аллозимная изменчивость в популяциях *Pinus sylvestris* и *Pinus cretacea* на Украине // Ботан. журн. — 2004. — 89, № 5. — С. 812—820.
8. 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.

9. Крутовский К.В., Политов Д.В., Алтухов Ю.П., Милютин Л.И. и др. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны (*Pinus sibirica* Du Tour). Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // Генетика. — 1989. — 25, № 11. — С. 2009—2032.
10. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. — М.: Наука, 1964. — 192 с.
11. Шурхал А.В., Подогаз 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.
12. Avise J. Systematic value of electrophoretic data // Systematic Zoology. — 1974. — 23. — P. 465—481.
13. Changuawi H., Kim Y.J., Yang S.Y., Chung H.J. Studies on the origin of *Prunus yedoensis* Matsumura. I. A comparative electrophoretic study on wild *P. subhirtella* in Mt. Hanla, cultivated *P. yedoensis* and *P. donarium* // Korean J. of Botany. — 1977. — 20, N 1. — P. 1—5.
14. Cheng S.Z., Yang W.H. Taxonomic studies of ten species of the genus *Juglans* based on isozymic zymograms // Acta Horticulturae Sinica. — 1987. — 14, N 2. — P. 90—96.
15. Conkle M.T., Schiller G., Grunwald C. Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *Pinus brutia* and closely related data // Systematic Botany. — 1988. — 13, N 3. — P. 411—424.
16. Davis B.J. Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — 121. — P. 404—427.
17. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. — 1972. — 106. — P. 283—292.
18. Wright S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. — 1965. — 9. — P. 395—420.

Рекомендує до друку  
Є.Л. Кордюм

Надійшла 21.11.2005

И.И. Коршиков<sup>1</sup>, Е.А. Мудрик<sup>1</sup>, А.Н. Лисничук<sup>2</sup>, Т.И. Великоридько<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Кременецкий ботанический сад

#### АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА РЕЛИКТОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. И *PINUS SYLVESTRIS* var. *CRETACEA* KALENICZ. ex KOM. В УКРАИНЕ

Представлены результаты сравнительного анализа генетической структуры реликтовых популяций *Pinus sylvestris* L. в Тернопольской и *P. sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. в Донецкой областях на основе изучения изменчивости 19 аллозимных локусов, а также их семенного потомства и пула отцовских гамет по 10 локусам. Установлено, что эти популяции находятся в большей генетической близости, чем популяции *P. sylvestris* var. *cretacea* и *P. sylvestris* в их общем ареале на Юго-Востоке Украины. В зародышах семян небольших реликтовых популяций обоих таксонов воспроизводится аллельное разнообразие, свойственное материнским деревьям.

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris*, *P. sylvestris* var. *cretacea*, реликтовые популяции, генетическая структура, подразделенность, дифференциация

I.I. Korshikov<sup>1</sup>, E.A. Mudrik<sup>1</sup>, A.N. Lisnichuk<sup>2</sup>, T.I. Velikoridko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Donetsk Botanical Gardens, Nat. Sci. of Ukraine

<sup>2</sup> Kremenets Botanical Gardens

ANALYSIS OF GENETIC RELATION OF *PINUS SYLVESTRIS* L. AND *PINUS SYLVESTRIS* var. *CRETACEA* KALENICZ. ex KOM. IN UKRAINE

A comparative analysis of genetic structure of relict populations of *Pinus sylvestris* L. and *P. sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. has been conducted in Ternopol and Donetsk regions, respectively, on the basis of variation of 19 allozyme loci as well as their seed progenies and pool of paternal gametes at 10 loci. These relict populations were determined to have closer genetic relationship than *P. sylvestris* var. *cretacea* and *P. sylvestris* populations in their shared range in the south-east of Ukraine. In seed embryos of relict populations of the both taxa, the allele diversity peculiar to maternal plants is maintained.

*Key words:* *Pinus sylvestris*, *P. sylvestris* var. *cretacea*, relict population, genetic structure, division, differentiation