



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.

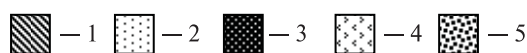
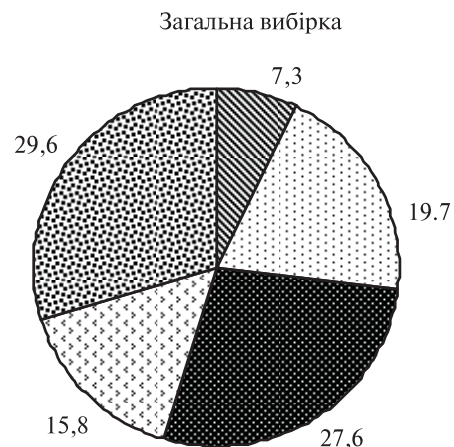
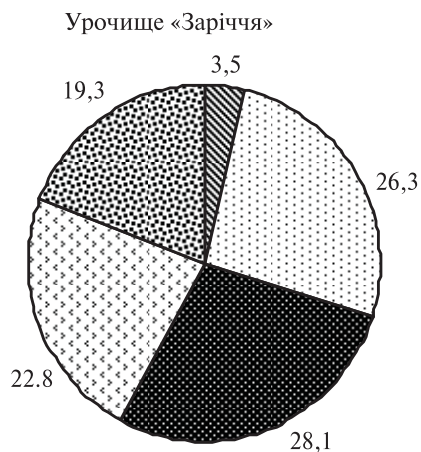
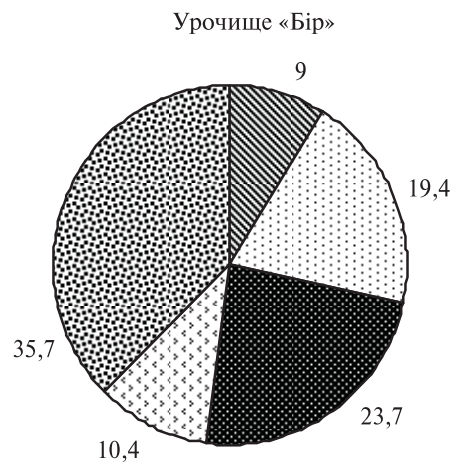
#### Об'єкти та методи досліджень

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), кислотофосфатази (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 Малего 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 Малего 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 Малоого 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	0,300	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 сіянці, 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.

