

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ МЕЖДУ СОСНОЙ КОХА (*PINUS KOCHIANA* KLOTZSCH EX KOCH) ГОРНОГО КРЫМА И СОСНОЙ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) КРЕМЕНЕЦКОГО ХОЛМОГОРЬЯ

И.И. КОРШИКОВ¹, доктор биологических наук;
Д.Ю. ПОДГОРНЫЙ²,

А.Н. ЛИСНИЧУК³, кандидат биологических наук

¹Донецкий ботанический сад НАН Украины,

²Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,

³Кременецкий ботанический сад

Введение

С момента открытия в 1858 г. кавказской сосны (*P. sylvestris* var. *hamata*) продолжается спор о ее таксономическом статусе. Е.Г. Бобров [1], проводивший анализ противоречивых сведений о номенклатуре этой кавказской и близкородственной сосны в Горном Крыму, насчитал 8 видовых и 17 наименований меньшего ранга. На основании палеогеографических данных Е.Г. Бобров [1] возводит распространенную на верхнем пределе лесов Горного Крыма сосну в ранг видового таксона - *P. kochiana* Klotzsch ex C. Koch. Л.Ф. Правдин [7], детально останавливаясь на морфологических, анатомических и физиологических особенностях кавказской сосны, относит ее к подвиду сосны обыкновенной - подвид крючковатая (*P. sylvestris* L. subsp. *hamata* (Steven) Fomin), а произрастающую в Крыму - к климатическому экотипу этого подвида - *P. sylvestris* L. subsp. *hamata* (Steven) Fomin var. *subalpina* Fomin. Однако наиболее отличительный морфологический признак этого подвида - крючковатость и загнутость апофизов к основанию щитка - встречается и у *P. sylvestris* в Германии, Тироле и в Шотландии [7]. Известный крымский ботаник Н.И. Рубцов [8] рассматривал эту крымскую сосну как *P. sylvestris*, а современные украинские ботаники выделяют ее в ранг отдельного вида - *P. kochiana* Klotzsch ex Koch. [3].

Этот краткий анализ сделан для того, чтобы показать, насколько противоречив спор о таксономическом ранге сосны, произрастающей на границе яйлы в Горном Крыму. Причина заметных расхождений в номенклатурной истории этого таксона - субъективность оценок изменчивости признаков и показателей, размерность которых зависит от неоднозначного влияния экологических факторов мест произрастания. В определении таксономического статуса этой сосны, исходя из современных представлений о геносистематике живых организмов, должны быть использованы наследственные дискретные признаки, не подверженные влиянию факторов внешней среды. К числу таких относятся аллозимы - первичные продукты генетического кода, позволяющие выяснить степень генетических различий у спорных таксонов. Аллозимы, как надежные генетические маркеры со 100 %-ной воспроизводимостью, очень часто применяют в решении вопросов геносистематики и эволюционной филогении лесообразующих хвойных [2, 6].

Цель исследований - на основе сравнительного анализа популяционно-генетической изменчивости *Pinus kochiana* и *P. sylvestris* выяснить степень генетического сходства и различий этих таксонов.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований были четыре популяции *P. kochiana* Горного Крыма: в урочищах «Красный камень» и «Гурзуфское седло» на южном склоне г. Караул-Кая, на юго-западном склоне от Никитской яйлы и на северном склоне от Бабуган-яйлы. Возраст деревьев, с которых были собраны шишки с семенами для последующего анализа аллозимной изменчивости, составлял 80-150 лет, а их выборки 29-30 особей

(всего 119). Для сравнительного анализа использовали три реликтовые популяции *P. sylvestris* Кременецкого холмогорья: «Бир», «Заречье», «Суражская дача». Выборки деревьев 130-летнего возраста насчитывали 29-68 растений (всего 154).

Для определения генотипа растения в качестве биохимических маркеров использовали изоферменты 9 ферментных систем: алкогольдегидрогеназы (ADH, К.Ф. 1.1.1.1), глутаматоксалоацетат-трансаминазы (GOT, К.Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназы (GDH, К. Ф. 1.4.1.2), диафоразы (DIA, К. Ф. 1.6.4.3), кислой фосфатазы (ACP, К.Ф. 3.1.3.2), лейцинаминопептидазы (LAP, К. Ф. 3.4.11.1), малатдегидрогеназы (MDH, К. Ф. 1.1.1.37), супероксиддисмутазы (SOD, К. Ф. 1.15.1.1) и формиатдегидрогеназы (FDH, К. Ф. 1.2.1.2), генетический контроль которых был установлен ранее [4]. Электрофоретическое разделение ферментов, экстрагируемых из восьми и более эндоспермов семян каждого растения, проводили в вертикальных пластинках 7,5%-ного полиакриламидного геля с рН 8,9 разделяющего геля в триглицериновом электродном буфере (рН 8,3) [10]. Для оценки уровня генетической изменчивости рассчитывали частоты аллелей изучаемых локусов в популяциях этих таксонов. Аллельную гетерогенность популяций исследуемых таксонов оценивали по стандартному χ^2 -тесту, а дифференциацию - с помощью генетической дистанции Нея [12]. В статистической обработке генетических данных использовали пакет компьютерных программ BIOSYS-1 [13].

Результаты и обсуждение

Электрофоретический анализ, выполненный для девяти ферментов, позволил описать у исследуемых таксонов 19 локусов, из которых три - Sod-1, Sod-2, Sod-3 были мономорфными у *P. sylvestris*, а у *P. kochiana* к ним добавлялся еще локус Sod-4. В популяциях *P. kochiana* выявлено 46, а у *P. sylvestris* - 52 аллеля, из которых 44 были общими для обоих таксонов (таблица 1). Наиболее изменчивыми у этих таксонов были семь локусов - Gdh, Got-2, Got-3, Dia-1, Acp, Lap-1 и Fdh. При сравнении частот аллелей трех популяций *P. sylvestris* и четырех *P. kochiana* существенная гетерогенность установлена для семи локусов - Gdh, Got-3, Dia-1, Dia-4, Acp, Lap-1 и Mdh-3. Значимая генотипическая гетерогенность выявлена для четырех локусов - Gdh, Got-3, Dia-4 и Mdh-3. В исследованных популяциях *P. kochiana* и *P. sylvestris* преобладающий аллель (1,00) встречался во всех локусах с частотой $> 0,500$. Согласно данным Г.Г. Гончаренко [2], который сравнивал семь форм *P. sylvestris*: сосну лесную (*sylvestris*), с. сибирскую (*sibirica*), с. карпатскую (*carpatica*), с. рижскую (*rigensis*), с. лапландскую (*lapponica*), с. меловую (*cretacea*) и с. крючковатую (*hamata*) по 24 аллозимным локусам, наибольшая аллельная гетерогенность выявлена для трех крымско-кавказских популяций *hamata*. Из этих трех популяций только одна им была взята в Горном Крыму, а две популяции сосны крючковатой - с Кавказа, которую многие ботаники рассматривают как *P. sosnovskyi* Nokai. В объединенной выборке растений этих трех крымско-кавказских популяций сосны крючковатой установлено, что в локусе 6-Pgd-2 преобладающий аллель (1,00) не встречается с преобладающей частотой. Г.Г. Гончаренко [2] выявлены также значимые отличия между формой *hamata* и шестью другими формами сосны по локусам Got-3, Dia-2, Mdh-3 и 6-Pgd-1. Кроме того, форма *hamata* оказалась полиморфной по локусу Idh, который у других форм был мономорфным [2].

Проведенный нами анализ аллельной и генотипической гетерогенности *P. kochiana* и *P. sylvestris* хотя и позволяет выявить локусы, по которым их популяции имеют различия в генетической структуре, однако не дает возможности выяснить степень генетической неидентичности этих таксонов. Для такой оценки часто используют коэффициент генетической дистанции (D_n) Нея [5, 12], при расчетах которого учитываются отклонения в аллельных частотах всех исследуемых локусов.

Значения D_N между тремя реликтовыми популяциями *P. sylvestris* варьировали в пределах 0,001-0,005, составив в среднем 0,003. Между четырьмя популяциями *P. kochiana* генетическая дистанция была несколько больше - 0,003-0,017, $D_n^{\wedge} = 0,010$. Практически на таком же уровне была генетическая дифференциация между *P. kochiana* и *P. sylvestris*- 0,005-0,015, $D_n^{\wedge} = 0,011$. Согласно данным Г.Г. Гончаренко [2] для форм *sylvestris*, *carpatica*, *rigensis*, *lapponica*, *cretacea* и *sibirica* средняя величина D_N составила 0,007, а между *hamata* и этими шестью формами - 0,024, т.е. *hamata* имеет более четко выраженную генетическую дифференциацию в сравнении с остальными исследованными формами *P. sylvestris*. Результаты проведенного нами сравнительного анализа не указывают на такие генетические отличия между *P. kochiana* и *P. sylvestris*. Возможно, это связано с тем, что мы изучали только крымские популяции *P. kochiana*, а в упоминаемом исследовании [2] из трех популяций *hamata* две были кавказскими. Генетические различия между кавказской и крымской сосной подтверждены с помощью анализа аллосимной изменчивости и другими авторами. Восточнокавказские горные популяции сосны крючковатой генетически значительно более удалены от североевразийской *P. sylvestris*, чем *P. kochiana* на горе Роман-Кош в Крыму. По этой причине предполагают существование на Восточном Кавказе подвида *Pinus sylvestris* L., ssp. *kochiana* (Klotzsch ex C.Koch) Elicin, а в Крыму только формы - *f. tavraca* (nova, nom. prov.) [9].

У молодых видов родов *Pinus* и *Picea* с неполной репродуктивной изоляцией величина D_N между популяциями обычно достигает 0,10, т.е. в процессе видообразования в геномах таких видов происходит не менее 10 аллельных замещений на 100 структурных локусов [11, 14]. В случае анализа формы *hamata* было подтверждено 2,4 аллельных замещения, поэтому ее рассматривают как генетически обособившуюся географическую расу *P. sylvestris*, оставляя за ней название *P. sylvestris* var. *hamata* Steven. [2]. По результатам нашего анализа у *P. kochiana* в сравнении с реликтовыми популяциями *P. sylvestris* произошло лишь 1,1 аллельных замещения структурных локусов, что в 9 раз меньше, чем у молодых видов родов *Pinus* и *Picea* [11, 14]. Такие генетические отличия обычно свойственны популяциям одного вида.

Таблица 1

Количество аллелей, аллельная и генотипическая гетерогенности, средняя полокусная гетерозиготность для четырех популяций *Pinus kochiana* Klotzsch ex Koch Горного Крыма и трех популяций *P. sylvestris* L. Кременецкого холмогорья

Ферменты	Локус	Количество аллелей			Х2-тест на гетерогенность между видами		Средняя гетерозиготность	
		<i>P. kochiana</i>	<i>P. sylvestris</i>	общих для обоих таксонов	аллелей	генотипов	<i>P. kochiana</i>	<i>P. sylvestris</i>
							ожидаемая / наблюдаемая	
Алкогольдегидрогеназа	Adh-1	2	3	2	17,9(12)	26,5(24)	0,168/0,143	0,161/0,098
	Adh-2	4	3	3	23,8(18)	25,8(32)	0,145/0,143	0,168/0,123
Глутаматдегидрогеназа	Gdh	2	2	2	18,9(6)**	38,9(14)***	0,385/0,404	0,472/0,533
Глутаматоксалоацетат- трансаминаза	Got-1	2	2	2	2,9(6)	2,9(7)	0,008/0,008	0,032/0,032
	Got-2	2	2	2	3,5(6)	17,4(14)	0,452/0,437	0,441/0,376
	Got-3	3	3	3	31,7(12)**	42,8(28)*	0,364/0,412	0,453/0,415
Диафораза	Dia-1	3	4	3	34,7(18)*	46,2(42)	0,427/0,462	0,470/0,403
	Dia-2	2	3	2	13,7(12)	14,9(16)	0,008/0,008	0,038/0,039
	Dia-4	3	3	3	35,7(12)***	58,5(28)***	0,159/0,109	0,084/0,078
Кислая фосфатаза	Acp	4	5	4	41,3(24)*	51,6(42)	0,379/0,471	0,362/0,389
Лейцинаминопептидаза	Lap-1	4	4	4	36,0(18)*	49,0(42)	0,329/0,353	0,234/0,221
	Lap-2	4	5	4	29,6(24)	50,6(42)	0,226/0,185	0,236/0,254
Малатдегидрогеназа	Mdh- 2	2	2	2	7,7(6)	7,8(7)	0,056/0,059	0,056/0,059
		3	4	2	30,1(12)**	53,5(28)**	0,501/0,437	0,401/0,441
Формиатдегидрогеназа	Fdh	2	2	2	8,7(6)	12,7(16)	0,132/0,109	0,249/0,227
Супероксиддисмутаза	Sod-4	1	2	1	8,4(6)	9,3 (6)	0,000/0,000	0,006/0,006
		46	52	44			0,197/0,197	0,203/0,197

Выводы

Результаты сравнительных исследований аллозимной изменчивости по 19 локусам четырех популяций *P. kochiana* Горного Крыма и трех реликтовых популяций *P. sylvestris* Кременецкого холмогорья показывают, что *P. kochiana* следует рассматривать как географическую форму *P. sylvestris* – *P. sylvestris* var. *kochiana* Klotzsch ex Koch. Этой форме угрожает биологическое загрязнение вследствие массовых посадок на яйле семян *P. sylvestris*, завезенных из-за пределов Крыма. Отсутствие репродуктивных барьеров между этими таксонами создает условия для гибридизации, что может привести к разрушению в ходе рекомбинантных событий уникальных коадаптированных блоков генов, свойственных *P. sylvestris* var. *kochiana* Klotzsch ex Koch. В конечном итоге такая миграция генов *P. sylvestris* будет способствовать формированию популяций с измененной генетической структурой этой географической формы.

Список литературы

1. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1978. – 190 с.
2. Гончаренко Г.Г. Геносистематика и эволюционная физиология лесообразующих хвойных. – Минск: Тэхналопя, 1999. – 188 с.
3. Екофлора України. Том 1. / Дідух Я.П., Плюта П.Г., Протопопова В.В. та ін. Відпов. ред. ЯП. Дідух. – Київ: Фітосоціоцентр, 2000. – 284 с.
4. Генетический контроль изоферментов сосны Коха в Горном Крыму / Коршиков И.И., Великоридько Т.И., Коба В.П., Подгорный Д.Ю., Калафат Л.А., Горлова Е.М. // Екологічні проблеми садівництва та інтродукції рослин: Збірник наукових праць Державного Никітського ботанічного саду. – Ялта, 2008. – Т. 130. – С. 112-119.
5. Ней М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. – Киев: КВЦ, 2004. – 406 с.
6. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. Pinaceae) Северной Евразии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2007. – 47 с.
7. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. – М.: Наука, 1964. – 192 с.
8. Рубцов Н.И. Растительный мир Крыма. – Симферополь: Таврия, 1978. – 129 с.
9. Санников С.Н., Петрова И.В. Феногеография популяций древесных растений: проблемы, методы и некоторые итоги // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – XXIX, № 2-3. – С. 288-296.
10. Davis B.J. Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404-427.
11. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone pines (*Pinus* subsect. *Oocarpa*) Millar C.I., Strauss S.H., Conkle M.T., Westfall R.D. // Sys. Bot. – 1988. – V. 13. – P. 351-370.
12. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. – 1972. – V. 106. – P. 283-292.
13. 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. – T. 72, № 4. – P. 281-283.
14. Wheeler N.C., Guries R.P. A quantitative measure of introgression between lodgepole and jack pines // Can. J. Bot. – 1987. – V. 65. – P. 1876-1885.

Рекомендовано к печати д.б.н. Захаренко Г.С.