

И.И. КОРШИКОВ¹, Н.С. ТЕРЛЫГА²

¹ Донецкий ботанический сад НАН Украины
Украина, 83059 г. Донецк, просп. Ильича, 110

² Криворожский ботанический сад НАН Украины
Украина, 50089 г. Кривой Рог, ул. Маршака, 50

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ КРЫМСКОЙ (PINUS PALLASIANA D. DON) С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ ФЕРТИЛЬНЫХ СЕМЯПОЧЕК В ИСКУССТВЕННЫХ НАСАЖДЕНИЯХ КРИВОРОЖЬЯ

*В течение трех лет у 100 растений *Pinus pallasiana* D. Don в четырех насаждениях Криворожья определяли опыленность семян. Были выделены деревья с постоянно высокими (80,8–98,4 %) и низкими (41,6–68,6 %) значениями этого репродуктивного показателя. По 22 аллозимным локусам оценены генетические отличия этих деревьев. Выборка деревьев с высокой опыленностью семян характеризовалась меньшей долей полиморфных локусов ($P_{99} = 0,773$), наблюдаемой ($H_O = 0,213$) и ожидаемой ($H_E = 0,228$) гетерозиготностью, чем альтернативная выборка растений ($P_{99} = 0,818$, $H_O = 0,281$, $H_E = 0,272$).*

Семенная продуктивность многих перекрестноопыляемых видов древесных растений во многом зависит от опыленности семян. Факторами, влияющими на опыление в насаждениях, особенно небольших, являются сила ветра, смена его направлений, количество осадков, наличие экранирующих препятствий, количество одновременно пылящих растений, их густота и др. Эмиссии промышленных предприятий, как правило, вызывают снижение уровня опыленности семян, например у хвойных, и, как следствие, — семенной продуктивности растений в насаждениях, произрастающих вблизи источников загрязнения [4]. Низкая семенная продуктивность древесных растений в популяциях и насаждениях может быть обусловлена недоопыленностью семян из-за недостатка жизнеспособной пыльцы и повышенной смертности опыленных семян у отдельных растений на гаметофитном этапе их развития. Даже при оптимальном пыльцевом режиме у отдельных растений в древостоях видов рода *Pinus* L. часть опыленных семян гибнет

до оплодотворения на первом году их гаметофитного развития [3–7]. Это одна из основных причин того, что семенная продуктивность отдельных растений в природных и искусственных древостоях видов рода *Pinus* L. значительно отличается. Многие из этих видов характеризуются очень низкой партеноспермией [7, 12]. У таких видов можно легко определить фактическое количество опыленных семян, подсчитав количество всех семян — недоразвитых (> 1 мм), пустых и полных, отделяющихся с крылатками от семенных чешуй в фертильном ярусе шишки [6, 7]. Считается, что избыточная смертность семян на гаметофитном и эмбриональном этапах их развития генетически запрограммирована, хотя определенную поправку следует сделать на условия опыления семян [4, 5, 10]. По указанным причинам максимально возможная семенная продуктивность растений в природных популяциях и искусственных насаждениях никогда не достигается.

Для расширения знаний о репродуктивной биологии хвойных в условиях техногенно загрязненной среды важным представляется исследование взаимосвязей между

опыленностью семян, семенной продуктивностью и генотипическими особенностями растений. Задавшись такой целью, мы в течение трех лет определяли эти репродуктивные показатели и генетические особенности у 100 растений сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) в четырех насаждениях Криворожья.

В каждом из насаждений было маркировано 25 деревьев, у которых в течение трех последовательных лет собирали по 20 и более здоровых шишек. У 10 из них определяли количество чешуй в фертильном ярусе и полных, пустых и недоразвитых семян.

Одно из насаждений находилось в зоне фонового загрязнения в Романовском урочище (РУ), второе — в зоне умеренного загрязнения среды на Первомайском железорудном отвале (ППР), а два других — в зоне сильного действия эмиссий Криворожского металлургического (КМК) и Северного горно-обогатительного (СевГОК) комбинатов.

Фактическую опыленность семян устанавливали, суммируя количество всех категорий семян, а потенциально возможную — по удвоенному количеству продуктивных чешуй в фертильном ярусе каждой шишки. В шишках выживают только опыленные семяпочки [3, 6, 7].

Для определения генотипов 100 деревьев *P. pallasiana* в качестве молекулярно-генетических маркеров использовали изоферменты 10 ферментных систем: глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT), глутаматдегидрогеназы (GDH), алкогольдегидрогеназы (ADH), кислой фосфатазы (ACP), формиатдегидрогеназы (FDH), диафоразы (DIA), супероксиддисмутазы (SOD), лейцинаминопептидазы (LAP), малатдегидрогеназы (MDH), малик-энзима (ME). Ферменты экстрагировали из каждого из 10—20 эндоспермов, которые выбирали случайно из общей выборки семян исследуемого растения. Электрофорез ферментов проводили в вертикальных пластинках 7,5 % полиакриламидного геля, используя трис-глициновый электродный буфер с pH 8,3 [8]. Гис-

тохимическое окрашивание изоферментов на гелевых пластинках выполняли по стандартным прописям [2].

Для оценки уровня генетической изменчивости и дифференциации изучаемых выборок деревьев *P. pallasiana* использовали показатели, наиболее часто применяемые в популяционно-генетических исследованиях: частоту аллелей, наблюдаемую (НО) и ожидаемую (НЕ) гетерозиготность, среднее количество аллелей на локус (А), долю полиморфных локусов по 99%-ному критерию (P99) [1]. Для анализа подразделенности и дифференциации выборок деревьев с разной опыленностью семян использовали показатели F-статистики Райта [13] и G-статистики Nei [11].

В результате трехлетних исследований во всех четырех насаждениях *P. pallasiana* в Криворожье были выявлены деревья с высокой и низкой выживаемостью фертильных семян и соответственно определена их фактическая опыленность. Средние значения этого показателя в разных насаждениях варьировали, хотя и отличались достаточно высокой стабильностью, о чем свидетельствуют, как правило, низкие значения CV (табл. 1). Максимальная опыленность семян от потенциально возможной в зависимости от насаждения изменялась в пределах 80,8—98,4 %, а минимальный уровень был существенно ниже — 41,6—68,6 %. У растений с высокой опыленностью семян были лучшей завязываемость семян и больший выход полных семян в расчете на шишку. Для категорий деревьев с высокой и низкой опыленностью семян в большинстве насаждений характерна избыточная пустоцветность, которая за единичным исключением (КМК) была существенно выше у растений с высоким значением показателя опыленности. По выходу недоразвитых семян значительных отличий между сравниваемыми группами деревьев не установлено. Среднее количество всех категорий семян в шишках растений заметно варьировало согласно значениям CV.

Таблица 1. Характеристика выборок деревьев с высокой и низкой выживаемостью фертильных семян из насаждений *Pinus pallasiana* в Криворожье (данные трехлетних наблюдений)

Место произрастания растений	Опыленность семян, %	Среднее количество семян разных категорий в одной шишке, шт.		
		полных	пустых	недоразвитых
<i>С высокой опыленностью семян</i>				
Романовское урочище	$86,7 \pm 2,1$ 9,3	$48,9 \pm 3,1$ 24,9	$13,5 \pm 1,8$ 51,7	$5,4 \pm 0,7$ 52,5
Первомайский железорудный отвал	$98,4 \pm 2,1$ 5,6	$48,3 \pm 2,7$ 15,1	$10,5 \pm 4,2$ 106,1	$3,3 \pm 0,6$ 52,0
Криворожский металлургический комбинат	$83,2 \pm 1,9$ 8,8	$29,2 \pm 2,6$ 34,0	$19,4 \pm 2,3$ 46,5	$6,3 \pm 1,4$ 87,9
Северный горно-обогатительный комбинат	$80,8 \pm 2,5$ 15,0	$27,5 \pm 3,3$ 51,0	$21,9 \pm 2,9$ 56,4	$5,1 \pm 0,4$ 34,9
<i>С низкой опыленностью семян</i>				
Романовское урочище	$41,6 \pm 3,5$ 32,2	$26,1 \pm 0,7$ 39,8	$6,4 \pm 1,2$ 73,5	$6,4 \pm 1,2$ 73,5
Первомайский железорудный отвал	$68,6 \pm 1,1$ 3,9	$36,7 \pm 3,7$ 24,6	$4,2 \pm 0,6$ 34,1	$4,3 \pm 2,6$ 151,2
Криворожский металлургический комбинат	$61,5 \pm 1,7$ 10,9	$24,4 \pm 2,1$ 33,7	$17,2 \pm 3,2$ 72,9	$4,8 \pm 1,1$ 91,0
Северный горно-обогатительный комбинат	$63,5 \pm 1,0$ 6,2	$21,1 \pm 2,3$ 48,3	$13,8 \pm 2,4$ 66,3	$7,1 \pm 1,2$ 64,3

Примечание. В числителе — $M \pm m$, в знаменателе — CV, %

У 100 растений на основании электрофоретического анализа ферментов были идентифицированы аллельные варианты 22 аллозимных локусов, из которых 18 были полиморфными. Поскольку деревьев с высокой и низкой опыленностью семян в насаждениях было мало, то для генетического анализа они были дополнительно объединены в две соответствующие выборки. Эти сравниваемые выборки (до 20 растений) несколько отличались по составу аллелей и генотипов, однако, существенной гетерогенности не установлено ни для одного из локусов.

В анализируемых выборках деревьев отмечено 4—5 достоверных случаев отклонения фактического распределения генотипов от теоретически ожидаемого согласно закону Харди—Вайнберга. При этом три случая были общими для локусов *Mdh-4*, *Dia-1* *Adh-2*. В шести случаях в обеих выборках растений существенные нарушения равновесного распределения генотипов бы-

ли связаны с недостатком, а в трех — с избытком гетерозигот. Деревья с высокой выживаемостью фертильных семян характеризовались несколько меньшей долей полиморфных локусов (77,3 %) в сравнении с альтернативной выборкой растений (81,8%), а также достоверно меньшим уровнем наблюдаемой гетерозиготности (табл. 2). Для этой выборки деревьев был характерен дефицит гетерозигот, что подтверждалось высокими положительными значениями индекса фиксации Райта.

Очевидно, высокая опыленность семян отдельных деревьев *P. pallasiana* в насаждениях Криворожья частично достигается за счет собственной пыльцы. Этим можно объяснить практически двукратное превышение количества пустых семян в шишках у группы деревьев с высокой выживаемостью фертильных семян в сравнении с альтернативной группой деревьев. Пустые семена образуются вследствие

Таблица 2. Значения основных показателей генетического полиморфизма для выборок деревьев *Pinus pallasiana* с высокой и низкой выживаемостью фертильных семян в насаждениях Криворожья

Опыленность семян	Доля полиморфных локусов	Среднее количество аллелей	Средняя гетерозиготность		Индекс фиксации Райта
			ожидаемая (HE)	наблюдаемая (HO)	
Высокая	0,773	0,273	0,228 ± 0,017	0,213 ± 0,016	0,066
Низкая	0,818	0,273	0,272 ± 0,019	0,281 ± 0,018	-0,033

гибели оплодотворенных семян. Эту гибель семян связывают с генетическим грузом и несовместимостью развивающегося зародыша с эндоспермом [5, 9, 10, 12].

Ранее нами были установлены значения показателей гетерозиготности для выборок растений с высокой и низкой выживаемостью опыленных семян в природных популяциях *P. pallasiana* в Крыму, которые составили: HO = 0,210—0,215 и HE = 0,210—0,213 [4]. Они практически соответствовали уровню этих показателей для группы деревьев с высокой опыленностью семян в насаждениях Криворожья. В искусственных насаждениях *P. pallasiana* в г. Мариуполе и его окрестностях группа деревьев с высокой опыленностью семян по уровню гетерозиготности (HO = 0,253, HE = 0,241) существенно превосходила альтернативную группу деревьев (HO = 0,195, HE = 0,200) [4].

Наличие значимых, но разнонаправленных изменений в уровнях гетерозиготности у деревьев с высокой и низкой выживаемостью фертильных семян в искусственных насаждениях Криворожья и Приазовья, а также их отсутствие у выборок деревьев в природных популяциях *P. pallasiana* в Крыму может свидетельствовать о неоднозначности индивидуального уровня генетической изменчивости материнских растений в реализации этого основополагающего этапа репродуктивного процесса. Очевидно, что на опыленности семян отражаются и генетические особенности отцовских гамет. Если сравнить среднее количество недоразвитых семян в шишках (см. табл. 1) или гаметофитную выживаемость

опыленных семян на первом году их развития [6, 7], то значительных отличий между альтернативными выборками растений из разных насаждений нет. Однако, если сопоставить количество этих неполноценных семян с количеством опыленных семян, то различия очевидны. Доля недоразвитых семян в шишках растений с низкой опыленностью семян в общем пуле семян существенно выше, чем у деревьев с высокими значениями этого показателя. По всей видимости, эти отличия также обусловлены генетическим фактором.

Следует отметить, что значения коэффициентов инбридинга популяции (выборки) относительно вида в целом (FST), а также межвыборочного разнообразия (GST) у двух анализируемых групп растений *P. pallasiana* были низкими, составив соответственно 0,015 и 0,014. Это означает, что 98,5 % всей генетической изменчивости приходится на внутригрупповую изменчивость и только 1,5 % — на межвыборочную. При этом вклад отдельных локусов в формирование этой изменчивости разный, наиболее существенный — Fdh-1, Mdh-2, Adh-1 и Adh-2. В подразделенность выборок деревьев из природных популяций Крыма и искусственных насаждений *P. pallasiana* в Приазовье значимый вклад вносили другие аллозимные локусы. По всей видимости, не только уровень гетерозиготности материнских растений, а и особенности их мультигенной системы и гаплотипов пыльцы определяют выживаемость опыленных семян *P. pallasiana* до и после оплодотворения.

Генетическая дистанция Nei между анализируемыми выборками составила 0,009.

Такой уровень дифференциации свойственен отдельным природным популяциям *P. pallasiana* в Крыму [4].

Таким образом, деревья с низкой опыленностью семян отличаются от деревьев с высокими значениями этого репродуктивного показателя в насаждениях *P. pallasiana* в Криворожье существенно большим уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. При этом в шишках растений с высокой опыленностью семян формируется значительно больше полных и пустых семян, чем у альтернативной группы деревьев. Количество недоразвитых семян в шишках растений обеих групп достаточно близкое, но их доля относительно опыленных семян явно выше у группы с низкими значениями этого показателя. Индивидуальные особенности опыления и формирования полных семян необходимо учитывать при отборе деревьев для создания региональной лесосеменной базы *P. pallasiana*, формируя ее из тех растений, которые отличаются хорошей опыленностью семян, высоким выходом полных семян и низкой пустоосемянностью.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. — М.: ИКЦ "Академкнига", 2003. — 431 с.

2. Гончаренко Г.Г., Падуров В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. — Гомель: Би., 1989. — 164 с.

3. Коба В.П. Эколого-ботанические особенности роста и репродукции сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) в Горном Крыму: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ялта, 1993. — 24 с.

4. Коршиков И.И., Терлыга Н.С., Бычков С.А. Популяционно-генетические проблемы дендротехнологической интродукции (на примере сосны крымской). — Донецк: Лебедь, 2002. — 328 с.

5. Кузнецова Н.Ф. Ультраструктура развивающихся семян сосны обыкновенной после самоопыления и свободного опыления // Лесоведение. — 1988. — № 1. — С. 70—74.

6. Некрасова Т.П. Изменчивость числа семян в шишках сосны в зависимости от опыления // Лесоведение. — 1986. — № 1. — С. 38—42.

7. Романовский М.Г. Гаметофитная смертность семян сосны обыкновенной // Генетика. — 1989. — 25, № 1. — С. 99—107.

8. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохим. методы в физиологии растений. — М.: Наука, 1977. — С. 113—136.

9. Френкель Р., Галун Э. Механизмы опыления, размножения и селекции растений. — М.: Колос, 1982. — 384 с.

10. Dogra P.G. Seed sterility and disturbances of embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in Pinaceae. — Stockholm: Roy. Coll. Forestry, 1967. — 97 p.

11. Nei M. Genetic distance between populations // Am. Naturalist. — 1972. — 106. — P. 283—292.

12. Sarvas R. Investigation on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris* // Comm. Inst. For. Fenn. — 1962. — 53, N 4. — P. 198—207.

13. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. — 1965. — 19. — P. 395—420.

Рекомендовал к печати
Б.А. Левенко

И.И. Коршиков¹, Н.С. Терлыга²

¹ Донецький ботанічний сад НАН України,
Україна, м. Донецьк

² Криворізький ботанічний сад НАН України,
Україна, м. Кривий Ріг

ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ДЕРЕВ СОСНИ КРИМСЬКОЇ (*PINUS PALLASIANA* D. DON) З ВИСОКОЮ ТА НИЗЬКОЮ ВИЖИВАНІСТЮ ФЕРТИЛЬНИХ НАСІННИХ ЗАЧАТКІВ У ШТУЧНИХ НАСАДЖЕННЯХ КРИВОРІЖЖЯ

Протягом трьох років у 100 рослин *Pinus pallasiana* D. Don у чотирьох насадженнях Криворіжжя визначали запиленість насінних зачатків. Було виділено дерева з постійно високими (80,8—98,4 %) і низькими (41,6—68,6 %) значеннями цього репродуктивного показника. За 22 алозимними локусами оцінено генетичні відмінності цих дерев. Вибірка дерев з високою запиленістю насінних зачатків характеризувалася меншою часткою поліморфних локусів ($P_{99} = 0,773$), наявною ($H_O = 0,213$) та очікуваною ($H_E = 0,228$) гетерозиготністю, ніж альтернативна вибірка рослин ($P_{99} = 0,818$, $H_O = 0,281$, $H_E = 0,272$).

I.I. Korshikov¹, N.S. Terlyga²

¹ Donetsk Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Donetsk

² Kriviy Rig Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Kriviy Rig

GENETIC PECULIARITIES OF PINUS PALLASIANA D. DON TREES WITH HIGH AND LOW RATE OF OVULE POLLINATION IN ARTIFICIAL STANDS OF KRIVIY RIG

During 3 years from 4 stands of 100 *Pinus pallasiana* D. Don plants ovule rate of pollination was

defined. As a result of this trees with constantly high (80.8—98.4 %) and low (41.6—68.6 %) values of this reproductive index were selected. Genetic distinctions of the given trees were assessed by 22 allozyme loci. Sample of trees with high ovule rate of pollination was characterized by lower polymorphic loci portion ($P_{99} = 0.773$), and by lower values of observed ($H_O = 0.213$) and expected ($H_E = 0.228$) heterozygosity, than that alternative one ($P_{99} = 0.818$, $H_O = 0.281$, $H_E = 0.272$).