



УДК 575.5:634.942:575(477)

© 2011

И. И. Коршиков, Я. В. Пирко, Л. А. Калафат, Е. М. Горлова,
Е. А. Мудрик

**Молекулярная филогенетика двухвойных сосен
Украины: уточнение таксономического статуса
на основе анализа аллозимной изменчивости**

(Представлено академиком НАН Украины Я. Б. Блюмом)

На підставі аналізу мінливості 18 алозимних локусів у популяційних вибірках шести автохтонних двохвойних сосен України визначено їх генетичну схожість та уточнено таксономічний статус. Встановлено, що як самостійні види можна розглядати лише чотири з них: *P. sylvestris* L., *P. pallasiana* D. Don, *P. mugo* Turra та *P. stankeviczii* (Sukacz.) Fomin, а *P. cretacea* Kalenicz. та *P. kochiana* Klotzsch ex Koch. — як ґрунтовий екотип та географічну форму *P. sylvestris*.

Род *Pinus* L., самый крупный и наиболее распространенный из хвойных в Северном полушарии, считается самым сложным в систематическом отношении среди сосновых. Ни один из родов голосеменных не подвергался такому детальному таксономическому исследованию и многочисленным ревизиям, как род *Pinus*, однако до сих пор нет единого представления о систематике этого рода. В этом можно легко убедиться, сравнив две принятые системы классификации: по W. B. Critchfield, E. L. Little [1] и G. Krüsmann [2]. Видовой состав даже в одноименных секциях данного рода в этих двух системах существенно отличается.

В частности, нет единого мнения в отношении таксономического статуса шести видов двухвойных автохтонных сосен Украины. Так, например, Е. Г. Бобров [3], который провел анализ противоречивых сведений о номенклатуре кавказской и близкородственной сосны, *P. kochiana* Klotzsch ex C. Koch, в Горном Крыму, выявил 8 видовых и 17 наименований более низкого ранга. На основании палеогеографических данных он возводит распространенную на верхнем пределе лесов Горного Крыма сосну в ранг видового таксона. Л. Ф. Правдин [4], 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 [4]. Известный крымский ботаник Н. И. Рубцов [5] рассматривал эту крымскую сосну как *P. sylvestris*, а современные украинские ботаники выделяют ее в ранг отдельного вида — *P. kochiana* Klotzsch ex Koch. [6].

Неоднократно проводилась ревизия статуса *P. cretacea* Kalenicz., которую отдельные ботаники возводят в ранг самостоятельного вида [6], другие же считают ее экотипом или формой *P. sylvestris* L., произрастающей в изолированных борах на меловых отложениях [3, 4]. Таким образом, все сказанное выше указывает на то, насколько противоречива информация о таксономическом статусе отдельных сосен, если номенклатурная история этих таксонов основана на субъективной оценке морфолого-анатомических признаков.

В реконструкции филогенетических взаимоотношений видов и в определении их таксономического статуса в последние десятилетия широко используют молекулярно-генетические маркеры. В отличие от количественных признаков фенотипа молекулярно-генетические маркеры характеризуются дискретностью, стабильностью проявления в различных тканях, высокой наследуемостью и не изменяются в ходе онтогенеза, а также в связи с действием различных факторов внешней среды. Изоферментный анализ с его 100%-й воспроизводимостью, позволяющий получать точные оценки степени генетического родства между спорными таксонами, широко применяют в геносистематике и эволюционной филогении лесообразующих хвойных [7, 8].

Поэтому целью нашего исследования было определение степени генетического родства и выяснение таксономического статуса шести двухвойных сосен Украины на основе аллозимной изменчивости в их природных популяциях.

Материал для генетико-таксономического анализа был собран в 20 популяциях *P. sylvestris* (Луганская, Харьковская, Сумская, Житомирская, Хмельницкая, Тернопольская, Ровенская, Ивано-Франковская, Черновицкая области); в пяти популяциях *P. mugo* Turta (Львовская, Ивано-Франковская обл.); в трех популяциях *P. cretacea* (Донецкая обл.); в пяти, четырех и двух популяциях *P. pallasiana* D. Don, *P. kochiana* и *P. stankewiczii* (Sukacz.) Fomin соответственно в Горном Крыму. Электрофоретический анализ девяти ферментных систем мегагаметофитов семян этих таксонов проводили в вертикальных пластинках 7,5%-го полиакриламидного геля. Для установления генотипа по каждому аллозимному локусу анализировали не менее шести мегагаметофитов. В результате исследований идентифицировано 18 аллозимных локусов, которые хотя бы у одного таксона отличались полиморфизмом. В номенклатуре аллелей 18 изученных локусов использовали следующий принцип: от преобладающего аллеля (1.00) *P. sylvestris* каждого локуса рассчитывали относительную подвижность на электрофореграммах остальных аллелей всех исследуемых шести таксонов и присваивали им соответствующие обозначения.

Аллельные частоты, отражающие генетическую структуру объединенных выборок растений каждого таксона, представлены в табл. 1. Наибольшие отличия в структуре и частотах аллелей отмечены для *P. stankewiczii* в сравнении с пятью другими двухвойными соснами. Локусы, по которым обнаруживаются значительные качественные расхождения при сравнении разных видов, именуют диагностическими [9]. В парах *P. stankewiczii* с другими пятью двухвойными соснами к таким относятся девять локусов: Adh-1, Adh-2, Fdh, Dia-1, Dia-2, Mdh-2, Gdh, Lap-1 и Sod-4. *P. pallasiana* от пяти остальных таксонов явно отличается по частотам аллелей локусов Adh-1 и Dia-2. Ранее существенные различия в аллельной структуре по этим локусам обнаружил Г. Г. Гончаренко [7] в исследованиях *P. nigra* (крымс-

Таблица 1. Аллельные частоты по 18 локусам в объединенных выборках из популяций шести видов двухвойных сосен в пределах их ареалов в Украине

Аллели	<i>P. pallasiana</i> , N = 210	<i>P. mugo</i> , N = 162	<i>P. stankewiczii</i> , N = 182	<i>P. sylvestris</i> , N = 657	<i>P. cretacea</i> , N = 71	<i>P. kochiana</i> , N = 199
1	2	3	4	5	6	7
Adh-1						
0	0,002	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
0.89	0,000	0,000	0,036	0,005	0,049	0,000
1.00	0,028	0,969	0,000	0,893	0,852	0,903
1.02	0,000	0,031	0,000	0,085	0,099	0,097
1.05	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
1.08	0,848	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000
1.13	0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1.16	0,036	0,000	0,926	0,000	0,000	0,000
1.20	0,000	0,000	0,035	0,000	0,000	0,000
Adh-2						
0	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,004
0.90	0,055	0,000	0,000	0,053	0,028	0,071
1.00	0,881	1,000	0,000	0,939	0,888	0,921
1.10	0,062	0,000	0,077	0,007	0,084	0,004
1.16	0,000	0,000	0,915	0,000	0,000	0,000
1.20	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000
Acp						
0	0,000	0,000	0,003	0,001	0,000	0,000
0.88	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
0.94	0,121	0,198	0,046	0,152	0,120	0,210
0.97	0,012	0,000	0,000	0,011	0,056	0,004
1.00	0,810	0,636	0,753	0,766	0,768	0,748
1.02	0,057	0,166	0,198	0,069	0,056	0,038
Mdh-2						
0	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
0.90	0,007	0,000	0,835	0,000	0,000	0,000
1.00	0,975	0,979	0,162	0,955	0,866	0,970
1.04	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000
1.08	0,018	0,003	0,000	0,045	0,134	0,030
Mdh-3						
0	0,000	0,000	0,005	0,011	0,000	0,000
0.83	0,005	0,015	0,465	0,001	0,000	0,000
0.86	0,618	0,860	0,508	0,243	0,218	0,433
0.94	0,010	0,015	0,000	0,001	0,000	0,012
1.00	0,354	0,110	0,022	0,726	0,761	0,555
1.02	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
1.03	0,000	0,000	0,000	0,004	0,014	0,000
1.05	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
1.12	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
1.15	0,013	0,000	0,000	0,004	0,007	0,000
Sod-1						
0	0,005	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
0.80	0,014	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000
1.00	0,981	1,00	0,947	1,00	1,00	1,00
Sod-2						
1.00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Таблиця 1. Продовження

1	2	3	4	5	6	7
Sod-3						
1.00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sod-4						
0	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0.90	0,000	0,000	0,994	0,013	0,014	0,000
1.00	0,995	1,00	0,006	0,987	0,986	1,00
Got-1						
0.80	0,000	0,030	0,000	0,001	0,000	0,000
0.90	0,002	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
1.00	0,986	0,967	0,683	0,981	1,00	0,996
1.10	0,012	0,003	0,317	0,015	0,000	0,004
Got-2						
0	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000
0.60	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000
1.00	0,512	0,805	0,584	0,652	0,669	0,647
1.12	0,488	0,171	0,416	0,328	0,331	0,353
1.14	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
1.20	0,000	0,006	0,000	0,006	0,000	0,000
1.25	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
Got-3						
0	0,000	0,000	0,003	0,001	0,000	0,000
0.60	0,011	0,140	0,000	0,002	0,000	0,000
1.00	0,907	0,830	0,965	0,645	0,831	0,935
1.08	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000
1.15	0,000	0,000	0,000	0,009	0,049	0,004
1.50	0,082	0,018	0,032	0,343	0,120	0,061
Lap-1						
0	0,000	0,052	0,000	0,007	0,014	0,013
0.95	0,012	0,335	0,000	0,076	0,049	0,168
0.97	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
1.00	0,928	0,597	0,061	0,882	0,902	0,794
1.05	0,060	0,016	0,939	0,029	0,035	0,025
Fdh						
0	0,010	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
0.53	0,000	0,000	0,934	0,000	0,000	0,000
0.80	0,052	0,003	0,025	0,010	0,000	0,000
1.00	0,928	0,895	0,000	0,859	0,761	0,928
1.13	0,000	0,000	0,041	0,000	0,000	0,000
1.20	0,010	0,102	0,000	0,125	0,239	0,072
1.27	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
1.40	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
Gdh						
0	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0.86	0,015	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
1.00	0,967	0,521	0,000	0,653	0,767	0,714
1.12	0,016	0,473	0,000	0,343	0,233	0,286
1.17	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
1.19	0,000	0,000	0,820	0,000	0,000	0,000
1.24	0,000	0,000	0,180	0,000	0,000	0,000

Таблица 1. Окончание

1	2	3	4	5	6	7
Dia-1						
0	0,010	0,009	0,009	0,008	0,000	0,000
0.72	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000
0.85	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
0.90	0,027	0,430	0,020	0,261	0,345	0,277
0.95	0,000	0,000	0,908	0,000	0,000	0,000
1.00	0,672	0,466	0,000	0,705	0,634	0,702
1.15	0,291	0,095	0,000	0,022	0,021	0,021
1.21	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
Dia-2						
0	0,003	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000
0.80	0,121	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0.90	0,820	0,015	0,006	0,016	0,014	0,004
1.00	0,056	0,918	0,961	0,964	0,958	0,996
1.10	0,000	0,067	0,025	0,020	0,028	0,000
Dia-4						
0	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000
0.90	0,031	0,016	0,060	0,005	0,014	0,029
1.00	0,667	0,684	0,902	0,976	0,986	0,912
1.10	0,302	0,300	0,033	0,019	0,000	0,059

Примечание. N — количество изученных деревьев.

кие популяции *P. pallasiana*) и *P. sylvestris*. У *P. mugo* в сравнении с близкородственными *P. sylvestris*, *P. cretacea* и *P. kochiana* произошла фактически фиксация альтернативных аллелей по локусу Mdh-3. Таких событий не выявлено ни по одному из исследуемых локусов у *P. sylvestris*, *P. cretacea* и *P. kochiana*. Каждый из таксонов отличался по качественно-количественным характеристикам в отношении редких аллелей.

Анализ аллельной структуры популяций исследуемых таксонов хотя и позволяет выявить локусы, по которым они имеют наибольшее несходство, однако не дает возможности выяснить степень их генетических различий. Для такой оценки часто используют коэффициент генетической дистанции Нея (D_N) [10], при расчетах которого учитываются отклонения в аллельных частотах всех исследуемых локусов.

Как и следовало ожидать из предыдущего анализа, наибольшие значения D_N (0,616–0,730) установлены для *P. stankewiczii* в сравнении с пятью остальными соснами (табл. 2). Второй по уровню генетических отличий была *P. pallasiana*, для которой значения D_N , исключая *P. stankewiczii*, варьировали в пределах 0,138–0,165. *P. mugo* в отношении к *P. sylvestris*, *P. cretacea* и *P. kochiana* имела значительно меньший уровень генетической дифференциации, $D_N = 0,033$ –0,057.

Таблица 2. Значения коэффициентов дистанции Нея для шести видов двухвойных сосен из подсекции *Sylvestris*

Вид	<i>P. pallasiana</i>	<i>P. mugo</i>	<i>P. stankewiczii</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. cretacea</i>	<i>P. kochiana</i>
<i>P. pallasiana</i>	—	0,165	0,730	0,149	0,145	0,138
<i>P. mugo</i>		—	0,621	0,053	0,057	0,033
<i>P. stankewiczii</i>			—	0,642	0,616	0,626
<i>P. sylvestris</i>				—	0,006	0,004
<i>P. cretacea</i>					—	0,010
<i>P. kochiana</i>						—

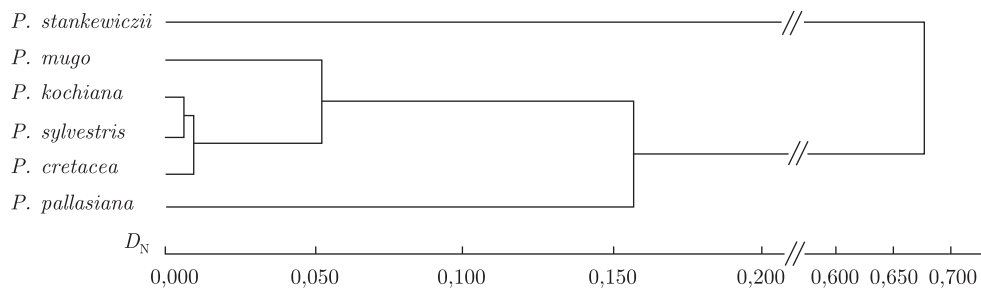


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Нея (D_N), показывающая степень генетической дифференциации шести видов сосен из подсекции *Sylvestris*

В рамках межпопуляционных отличий находились значения D_N при сравнении *P. sylvestris*, *P. cretacea* и *P. kochiana*. Если у *P. stankeviczii* в ходе самостоятельной эволюции произошло 61,6–73,0 аллельных замен на 100 локусов в сравнении с пятью остальными двухвойными соснами, то у спорных таксонов *P. cretacea* и *P. kochiana* — только 0,4–0,6 таких замещений в сравнении с близкородственной *P. sylvestris*. Это меньше, чем межпопуляционные отличия у *P. sylvestris* в разных растительных зонах Украины [11]. У эволюционно 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 [12]. Следовательно, *P. cretacea* и *P. kochiana* никак нельзя по результатам нашего анализа отнести к рангу самостоятельных видов. К такому выводу пришел ранее и Г. Г. Гончаренко [7], используя в качестве молекулярно-генетических маркеров изоферменты. Правы те ботаники [3, 4] и популяционные генетики [13], которые считают *P. cretacea* почвенным экотипом *P. sylvestris*, а *P. kochiana* — географической формой этого широкоареального вида. В то же время массовое лесоразведение *P. sylvestris* в степных районах Украины и в Горном Крыму вокруг изолированных популяций *P. cretacea* и *P. kochiana* может нарушить естественный эволюционный процесс этих таксонов за счет миграции генов.

Незначительные генетические отличия между *P. sylvestris* и *P. mugo*, что было подтверждено нами ранее [14], можно объяснить тем, что в процессе исторического развития этих видов в Центральной Европе на сопредельных территориях сформировались зоны гибридизации. Способность к гибридизации *P. sylvestris* и *P. mugo* доказана при искусственных скрещиваниях с получением полноценных гибридных семян [15]. Предполагают, что скрещиваясь между собой, они дали начало многочисленным промежуточным формам. По этой причине систематика вида *P. mugo* крайне запутана.

На основании полученных значений коэффициентов генетической дистанции (D_N) с применением невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа была построена дендрограмма (рис. 1), которая наглядно демонстрирует степень генетической дифференциации шести автохтонных двухвойных сосен Украины. Она еще раз подтверждает, что уровню видовых таксонов соответствуют только *P. stankeviczii*, *P. pallasiana*, *P. sylvestris* и *P. mugo*. Однако даже этот анализ не дает возможности точно ответить на вопрос, является ли *P. stankeviczii* самостоятельным видом или географическим изолятом средиземноморской сосны *P. brutia* Ten., а *P. pallasiana* — таким же изолятом *P. nigra* Arn. Для этого необходимы сравнительные популяционно-генетические исследования с использованием коренных популяций *P. brutia* и *P. nigra*. Очевидно, эта задача может быть решена в будущем

путем применения в геносистематических исследованиях методов интенсивно развивающейся популяционной геномики, что позволит выявить большие расхождения в геномах близкородственных таксонов, чем сравнительные популяционно-генетические исследования.

1. *Critchfield W. B., Little E. L.* Geographic distribution of the pines of the world. – Washington (D. C.): US Dep. of Agr., 1971. – 97 p.
2. *Krüssmann G.* Handbuch der Nadelgehöle. – Berlin; Hamburg: Parey, 1972. – 366 s.
3. *Бобров Е. Г.* Лесообразующие хвойные СССР. – Ленинград: Наука, 1978. – 190 с.
4. *Правдин Л. Ф.* Сосна обыкновенная. – Москва: Наука, 1964. – 192 с.
5. *Рубцов Н. И.* Растительный мир Крыма. – Симферополь: Таврия, 1978. – 129 с.
6. *Екофлора України.* Т. 1 / Я. П. Дідух, П. Г. Плюта, В. В. Протопопова та ін. Відпов. ред. Я. П. Дідух. – Київ: Фітосоціоцентр, 2000. – 284 с.
7. *Гончаренко Г. Г.* Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики. – Минск: Тэхналогія, 1999. – 188 с.
8. *Политов Д. В.* Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. *Pinaceae*) северной Евразии: Автореф. дис. . . . д-ра биол. наук: спец. 03.00.15 “Генетика”. – Москва, 2007. – 47 с.
9. *Lewontin R. C.* The Genetic Basis of Evolutionary Change. – New York; London: Columbia University Press, 1974. – 351 p.
10. *Ней М., Кумар С.* Молекулярная эволюция и филогенетика. – Киев: КВЦ, 2004. – 406 с.
11. *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.
12. *Millar C. I., Strauss S. H., Conkle M. T., Westfall R. D.* Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone pines (*Pinus* subsect. *Oocarpae*) // *Sys. Bot.* – 1988. – **13**. – P. 351–370.
13. *Коршиков И. И., Калафат Л. А., Тунда С. Н., Великоридько Т. И.* Аллозимная изменчивость в популяциях *Pinus sylvestris* L. и *Pinus cretacea* на Украине // *Бот. журн.* – 2004. – **89**, № 5. – С. 812–820.
14. *Коршиков И. И., Пирко Я. В.* Анализ систематических различий между *Pinus sylvestris* L. и *Pinus mugo* Turra по данным их популяционно-генетической изменчивости // *Бюл. Гл. ботан. сада.* – 2005. – Вып. 189. – С. 129–135.
15. *Патлай И. Н., Ирошников А. И., Молотков П. И.* Селекция и семеноводство сосны // *Селекция лесных пород.* – Москва: Наука, 1982. – 224 с.

Донецкий ботанический сад НАН Украины, Донецк
Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины, Донецк
Институт общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

Поступило в редакцию 04.11.2010

I. I. Korshikov, Ya. V. Pirko, L. A. Kalafat, E. M. Gorlova, E. A. Mudrik

The molecular phylogenetics of two-needle pines of Ukraine: verification of the taxonomic status based on the analysis of the allozyme variability

*Based on the analysis of variability of 18 allozyme loci in population samples of six autochthonous two-needle pines of Ukraine, their genetic similarity is determined, and the taxonomic status is corrected. It is found that the species *P. sylvestris* L., *P. pallasiana* D. Don, *P. mugo* Turra, and *P. stankeviczii* (Sukacz.) Fomin could be seen as the separate species, whereas *P. cretacea* Kalenicz. and *P. kochiana* Klotzsch ex Koch. – as the soil ecotypes and geographical forms of *P. sylvestris*.*