

УДК 575.1:630*165.3

С. И. Ивановская, науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
В. Е. Падутов, д-р биол. наук, зав. лабораторией
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
М. М. Барсукова, инженер (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
О. С. Максимюк, студент (ГГУ им. Ф. Скорины)

УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РАЗНОВОЗРАСТНЫХ ГРУПП СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В НАСАЖДЕНИИ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

На основе метода электрофоретического анализа изоферментов проведены исследования разновозрастных групп сосны обыкновенной из природного насаждения. На основании полученных аллельных частот рассчитаны показатели генетического разнообразия всех проанализированных групп и проведен сравнительный анализ уровня генетического полиморфизма. Установлено, что у подростка, при сравнении с материнскими деревьями, не происходит изменения уровня генетической изменчивости или генетической структуры, иными словами, характерный для насаждения генофонд сохраняется и воспроизводится в молодых поколениях.

Groups of tree of different age from a Scots pine natural population were analyzed by isozyme electrophoresis. Values of genetic variation for all the tree groups assayed were computed on the basis of allelic frequencies and a comparative analysis of genetic polymorphism was made. Relative to parent trees, the genetic structure and the level of genetic variation in progeny were found to remain unchanged. In other words, the gene pool characteristic of the stand is retained and reproduced in younger generations.

Введение. Генетическая изменчивость является основой способности живых организмов адаптироваться к изменениям со стороны окружающей среды через естественный отбор. Популяции с низким уровнем генетической изменчивости более восприимчивы к заболеваниям, загрязнению, изменению климата, разрушениям местообитаний вследствие человеческой деятельности или других катастрофических событий. Неспособность адаптироваться к изменениям окружающей среды увеличивает риск вымирания. Все более усиливающаяся опасность деградации окружающей среды привела к осознанию необходимости сохранения не только хозяйственно важных генетических ресурсов, но также редких и находящихся под угрозой исчезновения видов.

При сохранении генетических ресурсов, по мнению большинства исследователей, главная цель – сохранить как можно больше генетической изменчивости, которая найдена у изучаемого вида, поскольку генетическое разнообразие является базисным компонентом биоразнообразия, а генетические ресурсы являются потенциальным источником полезных генетических признаков.

Принято считать, что для популяций хвойных у взрослых материнских деревьев значения наблюдаемой гетерозиготности превышают таковые у их потомства на ранних стадиях развития. Необходимо отметить, что в настоящее время имеются противоречивые данные о том, насколько и в какой степени отличаются по уровню генетической изменчивости материнские деревья и их потомство.

В работе Н. В. Старовой с соавторами по сосне обыкновенной было показано, что наи-

меньший уровень средней наблюдаемой гетерозиготности характерен для зародышей и подростка, он постепенно увеличивается с возрастом насаждения и достигает пика в возрасте более 100 лет [1], то есть нарастает за счет отбора в ходе онтогенеза в пользу гетерозигот. Данные о том, что зародыши имеют более низкие значения наблюдаемой гетерозиготности, чем взрослые растения, были получены также российскими [2] и польскими учеными [3].

Однако, исследования, проведенные И. И. Камаловой с соавторами, по сравнению параметров генетической изменчивости взрослого насаждения сосны обыкновенной (более 120 лет) и производного насаждения естественного возобновления на гари (от 20 до 40 лет) выявили, что уровень наблюдаемой гетерозиготности у дочернего насаждения выше и разница составляет примерно 4% [4]. Интересно также отметить, что при исследовании насаждения в возрасте более 140 лет и дочернего насаждения на вырубке в возрасте 42–45 лет были получены сходные данные и разница по наблюдаемой гетерозиготности составила также около 4%.

Целью нашей работы было определение уровня генетического разнообразия материнских деревьев и подростка разного возраста из естественного насаждения сосны обыкновенной.

Материалы и методы. Материал для исследований был собран в природном насаждении сосны обыкновенной, произрастающем в Корневской экспериментальной лесной базе Института леса НАН Беларуси. Все отобранные деревья были разбиты на четыре группы: материнские деревья и подросток трех разных возра-

тов. В среднем было проанализировано примерно по 100 деревьев из каждой группы.

В качестве экспериментального материала использовались диплоидные ткани почек. Для гомогенизации и выделения ферментов применялся экстрагирующий буфер для вегетативных тканей [6]. Электрофоретический анализ изоферментов проводили в 13–14% крахмальном геле, с использованием трех буферных систем: трис-ЭДТА-боратная, рН 8,6; трис-цитратная, рН, 6,2; трис-цитрат/NaOH-боратная, рН, 8,65, с небольшими модификациями [5]. Гистохимическое окрашивание ферментов производилось по стандартным методикам, описанным в ряде руководств [5, 6]. Каждое дерево исследовалось по 11 ген-ферментным системам (аспартатаминотрансфераза – ААТ, алкогольдегидрогеназа – АДН, глутаматдегидрогеназа – GDH, глюкозофосфатизомераза – GPI, диафораза – DIA, изоцитратдегидрогеназа – IDH, лейцинаминопептидаза – LAP, малакдегидрогеназа – MDH, флюоресцентная эстераза – FL-EST, фосфоглюкомутаза – PGM, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа – 6-PGD). Анализ проводили на основе 18 изоферментных локусов.

В данной работе был использован ряд статистических показателей, описывающих генетическую структуру популяций и уровень генетической изменчивости [7, 8, 9].

Ошибку средней гетерозиготности рассчитывали по формуле

$$S = \frac{1}{L} \sqrt{\frac{H_1(1-H_1)}{n_1} + \dots + \frac{H_L(1-H_L)}{n_L}},$$

где L – количество проанализированных локусов; H – показатель гетерозиготности по отдельному локусу; n – количество исследованных особей.

Достоверность различий показателей средней гетерозиготности определялась на основании коэффициента Стьюдента:

$$t = \frac{H_1 - H_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}},$$

где H – средняя гетерозиготность, S – ошибка средней гетерозиготности.

Результаты и обсуждение. Генетическим анализом нами были установлены генотипы всех проанализированных деревьев по 18 изоферментным генам и рассчитаны аллельные

частоты для четырех разновозрастных групп из природного насаждения *P. sylvestris*.

У четырех проанализированных групп только один локус был мономорфным – Idh, остальные 17 – полиморфными. Ген Pgm-2 был мономорфным у подростка 1–2 лет и слабополиморфным у материнских деревьев и подростка 5–6 и 15–18 лет. В общей сложности выявлено 54 аллельных варианта. При сравнении аллельных частот между группами следует отметить, что различия по 8 генам (Pgm-1, Ghi, Mdh-1, Mdh-2, Dia-2, Lap-1, Aat-1, Aat-3) не превышают 5% (таблица). По семи локусам (Fl-Est, Pgm-1, Mdh-3, Gdh, Lap-2, Aat-2, Adh-1, Adh-2 и 6-Pgd-2) выявлены несколько большие различия – от 5 до 10%. Выявленные различия в аллельных частотах между материнскими деревьями и подростом в пределах одного насаждения были меньше, чем между различными природными популяциями сосны обыкновенной, произрастающими в Беларуси [12].

На основе полученных аллельных частот для материнских деревьев и подростка были рассчитаны основные показатели генетического разнообразия (таблица). Как следует из таблицы, доля полиморфных локусов по 99% критерию (P_{99}) у материнских деревьев совпадает с подростом 15–18 лет (0,889) и несколько выше, чем у подростка 1–2 и 5–6 лет (0,778), в то же время по 95% критерию (P_{95}) этот показатель совпадает у материнских деревьев и подростка 5–6 лет (0,556) и ниже, чем у подростка 1–2 (0,611) и 15–18 лет (0,667). Параметр среднего числа аллелей на локус у материнских деревьев также ниже, чем у подростка, за исключением подростка 1–2 лет. Расчет средней ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности показал, что у подростка эти показатели несколько выше, чем у материнских деревьев, что подтверждает данные, полученные И. И. Камаловой с соавторами [4]. Тенденция увеличения гетерозиготности у подростка не случайна и связана с недостаточной выборкой материнских деревьев, ибо в процессы опыления вовлечено гораздо большее количество деревьев. Однако эти объяснения являются гипотетическими, поскольку выявленные различия статистически недостоверны. В данном случае важно то, что в исследованном насаждении естественного происхождения снижения гетерозиготности у последующих поколений нами выявлено не было.

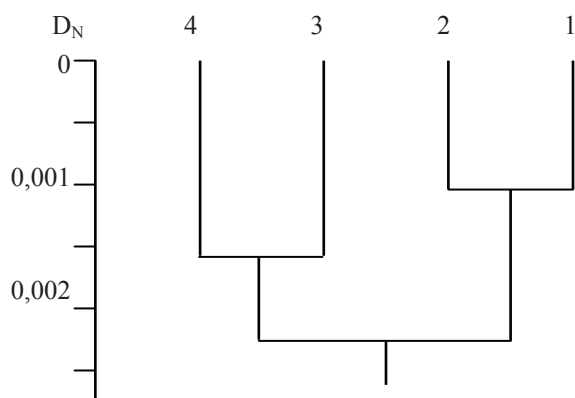
Значения основных показателей генетической изменчивости у деревьев сосны обыкновенной из разновозрастных групп

Анализируемая группа	Доля полиморфных локусов		Число аллелей на локус, A	Средняя гетерозиготность	
	P_{95}	P_{99}		ожидаемая, H_e	наблюдаемая, H_o
Материнские деревья	0,556	0,889	2,611 ± 0,979	0,217 ± 0,009	0,219 ± 0,009
Подрост 1–2 года	0,611	0,778	2,556 ± 1,042	0,235 ± 0,008	0,221 ± 0,008
Подрост 5–6 лет	0,556	0,778	2,778 ± 1,003	0,238 ± 0,011	0,238 ± 0,011
Подрост 15–18 лет	0,667	0,889	2,889 ± 1,023	0,236 ± 0,009	0,232 ± 0,009

Исходя из коэффициентов генетической дистанции Неи, нами была установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными группами. Среднее значение генетической дистанции Неи для исследованных групп деревьев было равно 0,0017. Полученные значения генетической дистанции Неи значительно ниже выявленных для насаждений сосны обыкновенной естественного происхождения на территории Беларуси, среднее значение для которых было равно 0,009 [12].

Таким образом, очень низкие значения генетической дистанции Неи указывают на большое сходство генетических структур проанализированных разновозрастных групп сосны обыкновенной.

На основании значений коэффициентов генетической дистанции с использованием невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) была построена дендрограмма, позволяющая проиллюстрировать степень генетической дифференциации среди изученных популяций сосны обыкновенной, которая представлена на рисунке. Как видно, наиболее близок по генетической структуре к материнским деревьям подрост 1–2 лет, затем к ним подсоединяются подросты 5–6 лет и 15–18 лет, объединенные в отдельный кластер.



Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации между исследованными группами *P. sylvestris* в насаждении естественного происхождения: 1 – материнские деревья; 2 – подрост 1–2 лет; 3 – подрост 5–6 лет; 4 – подрост 15–18 лет

Заключение. Исходя из полученных нами данных, в исследованном насаждении естественного происхождения сосны обыкновенной у разновозрастных групп растений не происходит сдвигов ни по уровню изменчивости, ни по генетической структуре. Имеющиеся

колебания значений являются статистически недостоверными.

Литература

1. Генетическая изменчивость сосны обыкновенной в возрастных группах / Н. В. Старова [и др.] // Генетика. – 1990. – Т. 26, № 3. – С. 498–505.
2. Политов, Д. В. Динамика аллозимной гетерозиготности в дальневосточных популяциях кедрового стланика *Pinus pumila* (Pall.) Regel: сравнение зародышей и материнских растений / Д. В. Политов, М. М. Белоконов, Ю. С. Белоконов // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 10. – С. 1348–1358.
3. Kosinska, J. Genetic variability of Scots Pine Maternal Populations and Their Progenies / J. Kosinska, A. Lewandowski, W. Chalupka // Silva Fennica. – 2007. – V. 41, № 1. – P. 5–12.
4. Генетическая изменчивость ферментных локусов в коренных и возобновившихся насаждениях сосны (*Pinus sylvestris* L.) / И. И. Камалова [и др.] // Генетика и селекция лесных древесных растений / Сб. науч. тр. НИИЛГиСВ. – Воронеж: Артефакт, 2008. – С. 70–80.
5. Гончаренко, Г. Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов, В. В. Потенко. – Гомель: Полеспечатать, 1989. – 164 с.
6. Cheliak, W. M. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species / W. M. Cheliak, J. A. Pitel. – Ottawa: Canadian Forestry Service, 1984. – 49 p.
7. Айала, Ф. Введение в молекулярную и эволюционную генетику / Ф. Айала. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
8. Гончаренко, Г. Г. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири / Г. Г. Гончаренко, А. Е. Силин. – Минск: Тэхналогія, 1997. – 191 с.
9. Гончаренко, Г. Г. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. – 197 с.
10. Животовский, Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях / Л. А. Животовский // Итоги науки и техники. Общая генетика. – М.: ВИНТИ, 1983. – С. 76–104.
11. Плохинский, Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. – М.: МГУ, 1970. – 367 с.
12. Падутов, В. Е. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси / В. Е. Падутов. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. – 144 с.

Поступила 14.04.2010