

УДК 575.1

С. И. Ивановская, научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)**ОЦЕНКА ГЕНОФОНДА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)
В ПЛЮСОВЫХ НАСАЖДЕНИЯХ БЕЛАРУСИ
ПО ДАННЫМ ИЗОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

На основе метода электрофоретического анализа изоферментов проведены исследования плюсовых насаждений сосны обыкновенной из Беларуси. Установлено, что в среднем уровень их генетического разнообразия (ожидаемая гетерозиготность (H_e) = 25,0%; наблюдаемая гетерозиготность (H_o) = 25,6%) достоверно превышает таковой, установленный в целом для вида сосны обыкновенной в Беларуси (H_e = 24,0%; H_o = 24,7%) (t = 2,77 при $P < 0,01$ для H_e ; t = 2,49 при $P < 0,05$ для H_o). Показано, что в ходе популяционного семеноводства, основанного на массовом отборе (отбор лучших, плюсовых насаждений), можно при повышении продуктивности создаваемых лесных культур обеспечить сохранение видового генофонда.

On the basis of electrophoretic analysis of isoenzyme the research of Scots pine plus stands was conducted in Belarus. It was established that the level of their genetic variation (expected heterozygosity (H_e) = 25.0%; and observed heterozygosity (H_o) = 25.6%) for certain exceeds the usual ranks of genetic variation for Scots pine in Belarus (H_e = 24.0%; H_o = 24.7%) (t = 2.77 when $P < 0.01$ for H_e ; t = 2.49 when $P < 0.05$ for H_o). It was shown that in the course of the seed population, based on the mass selection (selection of the best plus stands) it is possible to support the conservation of the species gene pool, while increasing the productivity of the created forest cultures.

Введение. В настоящее время развитие лесной селекции, генетики и семеноводства предусматривает совместное использование традиционных подходов к изучению древесных растений и современных методов, одними из которых являются молекулярно-генетические. При этом научные основы сохранения биоразнообразия и организации рационального лесопользования предусматривают знание количественных оценок популяционно-генетических параметров, что возможно на базе молекулярных маркеров [1]. Наряду с широким использованием методов анализа изменчивости ДНК для изучения популяционно-генетической структуры, внутри- и межвидовой дифференциации и гибридизации древесных растений, одним из главных инструментов продолжают оставаться изоферментные генные маркеры [2, 3, 4].

Плюсовые насаждения, которые являются одними из самых высокопродуктивных, высококачественных и устойчивых для данных лесорастительных условий древостоев, относятся к объектам постоянной лесосеменной базы [5]. В Беларуси на начало 2013 г. насчитывалось более 80 плюсовых насаждений сосны обыкновенной, общей площадью 664,2 га. Являясь исходным материалом для развития селекционного семеноводства, плюсовые насаждения должны представлять собой основной генетический фонд, который должен не только обеспечивать воспроизводство высокопродуктивных древостоев [6], но и сохранение наибольшего объема генетического потенциала вида.

Целью исследования являлась оценка уровня генетического разнообразия и дифференциации плюсовых насаждений сосны обыкновенной в Беларуси на основе метода электрофоретического анализа изоферментов.

Материалы и методы исследований. Материал для исследований был собран в 14 плюсовых насаждениях сосны обыкновенной, произрастающих в Беларуси (рис. 1).

В качестве экспериментального материала использовались диплоидные ткани почек. Для гомогенизации и выделения ферментов применялся экстрагирующий буфер для вегетативных тканей [7]. Всего было проанализировано 1110 деревьев (от 30 до 107 деревьев на насаждение), равномерно расположенных по всей площади объекта и отстоящих друг от друга на расстоянии не менее 10 м [8].

Электрофоретическое фракционирование изоферментов проводили в 13–14%-ном 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 [9], с модификациями. Гистохимическое выявление ферментов производилось по стандартным методикам [7, 9]. Каждое дерево исследовалось по 11 генферментным системам, которые кодируются 20 изоферментными локусами.

Для проведения исследований был использован ряд параметров, описывающих генетическую структуру популяций и уровень генетической изменчивости [3, 9].

Достоверность различий показателей средней гетерозиготности определялась на основании коэффициента Стьюдента [10]:

$$t = \frac{H_1 - H_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}, \quad (1)$$

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



Рис. 1. Сбор экспериментального материала в плюсовых насаждениях сосны обыкновенной Беларуси: 1 – Верхнедвинский лесхоз; 2 – Россонский лесхоз, Россонское лесничество (лес-во); 3 – Россонский лесхоз, Заборское лес-во; 4 – Слуцкий лесхоз; 5 – Молодечненский лесхоз; 6 – Логойский лесхоз; 7 – Ушачский лесхоз; 8 – Городокский лесхоз; 9 – Волковысский лесхоз; 10 – Слонимский лесхоз; 11 – Ельский лесхоз; 12 – Корневская ЭЛБ; 13 – Гомельский лесхоз; 14 – Буда-Кошелевский лесхоз

Результаты и обсуждение. В ходе проведения генетического анализа были определены генотипы всех проанализированных деревьев по 20 изоферментным генам и рассчитаны аллельные частоты для всех исследованных плюсовых насаждений *P. sylvestris*.

В целом выявлено 68 аллельных вариантов. Наиболее изменчивыми являются локусы Aat-2, Aat-3, Adh-1, Adh-2, Gdh, Dia-1, Fe, Mdh, 6-Pgd-1, 6-Pgd-2, поскольку гетерозиготность по ним составила более 30%. Наименее полиморфными оказались гены Aat-1, Idh Mdh-1, Mdh-2 и Pgm-2 с гетерозиготностью менее 5%. Выявленные различия в аллельных частотах между исследованными плюсовыми насаждениями сосны обыкновенной находились в пределах различий в частотах аллелей, обнаруженных на видовом уровне в Беларуси [3].

Главные показатели генетического разнообразия, рассчитанные на основе полученных аллельных частот, представлены в таблице.

Как следует из таблицы, доля полиморфных локусов колеблется от 0,75 до 0,90 по 99%-ному критерию (P_{99}) и от 0,50 до 0,75 по 95%-ному критерию (P_{95}). Величина значений среднего числа аллелей на локус (A) варьирует от 2,3 до 2,9. Наиболее точным параметром, определяющим уровень генетической изменчивости в популяциях, является средняя гетерозиготность: наблюдаемая H_o (фактическая) и ожидаемая H_e (рассчитанная из аллельных частот). Точность определения средней наблюдаемой гетерозиготности зависит от размера выборки исследуемых деревьев, однако параметр средней ожидаемой гетерозиготности не имеет таких ограничений. Расчет средних значений ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготностей показал, что в 12 проанализированных плюсовых насаждениях уровень генетической изменчивости соответствует и даже достоверно выше (Молодечненский и Логойский лесхозы) такового, установленного в сосновых древостоях эксплуатационных лесов, и только в двух лесничествах (Россонский лесхоз) – достоверно ниже. Наиболее высокий уровень H_e и H_o выявлен в плюсовом насаждении из Молодечненского лесхоза (0,269 и 0,289 соответственно), а наиболее низкий уровень обоих показателей – в плюсовых насаждениях из Россонского лесхоза: H_e составило 0,217 в плюсовом насаждении в Заборском лесничестве, H_o – 0,224 в Россонском лесничестве. В среднем значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности для плюсовых насаждений сосны обыкновенной составили 0,250 и 0,256 соответственно. Сравнение полученных данных по средней гетерозиготности с усредненными значениями H_e и H_o для сосны обыкновенной в Беларуси в целом (0,240 и 0,247 соответственно) показало, что средние значения гетерозиготностей плюсовых насаждений достоверно превышают таковые, выявленные в природных популяциях. Рассчитанные значения t -критерия Стьюдента для ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготностей составили соответственно 2,77 (99% уровень значимости) и 2,49 (95% уровень значимости).

Анализ литературных сведений о генетическом разнообразии сосны обыкновенной, произрастающей в восточно-европейской части ареала, включающей также территорию Беларуси, показал широкий диапазон полученных значений. Так, например, если в исследовании Гончаренко, Силина [11] средние значения показателей гетерозиготности H_e и H_o в популяциях сосны обыкновенной были равны 0,283 и 0,275, Санникова и Петровой [4] – 0,259 и 0,248 соответственно, то в работе Шигаповой и Шигапова [12] данные параметры составили 0,170 и 0,149 соответственно. Такое варьирование показателей может быть обусловлено как методологическими, так и региональными особенностями.

Значения основных показателей генетической изменчивости у деревьев сосны обыкновенной из плюсовых насаждений Беларуси

Лесхоз	Доля полиморфных локусов		Число аллелей на локус*		Средняя гетерозиготность*	
	P_{95}	P_{99}	$A > 0\%$	$A > 1\%$	H_e	H_o
1. Верхнедвинский	0,650	0,750	2,750	2,200	0,235 ± 0,009	0,252 ± 0,009
2. Россонский, Россонское лесничество	0,600	0,850	2,850	2,250	0,241 ± 0,009	0,224 ± 0,009
3. Россонский, Заборское лесничество	0,500	0,750	2,500	2,100	0,217 ± 0,009	0,245 ± 0,009
3. Слуцкий	0,600	0,850	2,800	2,350	0,254 ± 0,009	0,258 ± 0,009
4. Молодечненский	0,750	0,900	2,800	2,350	0,269 ± 0,009	0,289 ± 0,009
5. Логойский	0,650	0,900	2,900	2,150	0,263 ± 0,009	0,277 ± 0,009
6. Ушачский	0,600	0,750	2,600	2,200	0,242 ± 0,009	0,253 ± 0,009
7. Городокский	0,650	0,800	2,650	2,300	0,248 ± 0,009	0,257 ± 0,009
8. Волковысский	0,650	0,800	2,300	2,300	0,259 ± 0,016	0,270 ± 0,016
9. Слонимский	0,650	0,850	2,600	2,250	0,247 ± 0,011	0,248 ± 0,011
10. Ельский	0,550	0,750	2,300	2,000	0,237 ± 0,012	0,243 ± 0,012
11. Корневская ЭЛБ	0,700	0,850	2,350	2,350	0,259 ± 0,014	0,284 ± 0,013
12. Гомельский	0,650	0,750	2,450	2,300	0,236 ± 0,010	0,242 ± 0,010
13. Буда-Кошелевский	0,600	0,750	2,200	2,200	0,244 ± 0,014	0,278 ± 0,014
14. В целом для плюсовых насаждений	0,600	0,850	3,400	2,350	0,250 ± 0,003	0,256 ± 0,003
15. В целом для природных популяций эксплуатационных лесов	0,650	0,850	3,600	2,350	0,240 ± 0,002	0,247 ± 0,002

* Значения показателей приведены с ошибкой среднего.

В то же время авторами указывается превышение уровня средней гетерозиготности сосны обыкновенной в выборках, отобранных в лучших по комплексу морфологических признаков популяциях [12]. Исследования, проведенные с использованием ДНК-маркеров (ISSR-анализ), также подтвердили высокий уровень полиморфизма проанализированного плюсового насаждения сосны обыкновенной, генетическое разнообразие которого несколько превышало уровень генетической изменчивости на видовом уровне в Среднем Поволжье (0,2735 и 0,2570 соответственно) [13].

В ходе исследования с использованием F -статистики Райта и G -статистики Неи для исследованных плюсовых насаждений сосны были определены следующие показатели: значения инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}), инбридинга особи относительно вида в целом (F_{IT}) и инбридинга популяции относительно всего вида (F_{ST}), а также доли межпопуляционного разнообразия (G_{ST}).

Величины F_{IS} находились в пределах от $-0,338$ до $0,045$, составляя в среднем $-0,038$. Коэффициент F_{IT} , варьируя от $-0,315$ до $0,051$, равнялся в среднем $-0,027$. Отрицательные средние значения этих двух показателей свидетельствуют об избытке гетерозигот, который существует в плюсовых насаждениях. Следует отметить, что выявленные средние значения F_{IS} и F_{IT} превышают значения, полученные для усредненной выборки природных популяций сосны обыкновенной из Беларуси, которые также имеют отрицательные значения. Полученные

значения показателей подразделенности F_{ST} и G_{ST} (0,011 и 0,014 соответственно), указывают на то, что генетическая структура исследованных плюсовых насаждений сосны обыкновенной в целом однородна.

На основе коэффициентов генетической дистанции Неи (D_N) установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными насаждениями.

Наиболее сходными генетическими структурами характеризовались плюсовые насаждения из Верхнедвинского и Россонского (Россонское лесничество), Логойского и Слуцкого, Слонимского и Ушачского лесхозов, Слонимского и Россонского (Россонское лесничество), поскольку значение D_N между этими парами насаждений составило 0,002. Наибольшие различия выявлены между плюсовым насаждением из Россонского (Заборское лесничество) лесхоза и остальными проанализированными древостоями, что указывает на его несколько своеобразную генетическую структуру, отличающуюся от других плюсовых насаждений из Беларуси. Среднее значение генетической дистанции Неи, полученное для исследованных насаждений, равно 0,006.

На основании значений коэффициентов D_N с использованием невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) была построена дендрограмма, позволяющая проиллюстрировать степень генетической дифференциации среди изученных плюсовых насаждений сосны обыкновенной, которая представлена на рис. 2.

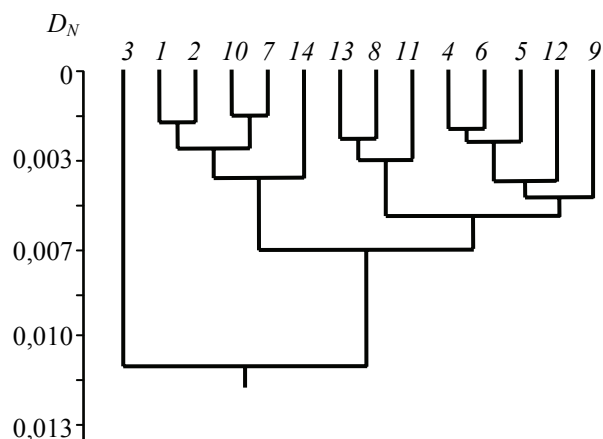


Рис. 2. Дифференциация исследованных плюсовых насаждений *P. Sylvestris*:

- 1 – Верхнедвинский лесхоз;
 2 – Россонский лесхоз, Россонское лес-во;
 3 – Россонский лесхоз, Заборское лес-во;
 4 – Слуцкий лесхоз; 5 – Молодечненский лесхоз;
 6 – Логойский лесхоз; 7 – Ушачский лесхоз;
 8 – Городокский лесхоз; 9 – Волковысский лесхоз;
 10 – Слонимский лесхоз; 11 – Ельский лесхоз;
 12 – Корневская ЭЛБ; 13 – Гомельский лесхоз;
 14 – Буда-Кошелевский лесхоз

Из рисунка видно, что все проанализированные плюсовые насаждения сосны обыкновенной формируют три кластера. Отдельно отстоит насаждение № 3 из Россонского лесхоза (Заборское лесничество), что также свидетельствует об отличиях его генетической структуры от остальных исследованных плюсовых насаждений. Интересно отметить, что это плюсовое насаждение имеет самое низкое значение ожидаемой гетерозиготности (таблица), достоверно отличающееся от установленного в сосновых древостоях эксплуатационных лесов. Проведенная кластеризация не выявила закономерностей в распределении насаждений в зависимости от географической удаленности или типа лесорастительных условий произрастания (восемь из исследованных плюсовых насаждений относятся к соснякам мшистым). Однако определенная тенденция объединения проанализированных древостоев в группы была выявлена при анализе возраста исследованных насаждений. Плюсовые насаждения под номерами 1, 2, 7, 10 и 14 составляют кластер, в который вошли насаждения в основном младше 100 лет (за исключением № 14 из Буда-Кошелевского лесхоза, возраст которого 100 лет). Остальные плюсовые насаждения № 4–6, 8, 9, 11–13, возраст которых составляет более 100 лет (за исключением № 4 – 90 лет), формируют второй кластер. Следует также отметить, что плюсовые насаждения, составляющие второй кластер, обладают в основном более высокими показателями

средней гетерозиготности, по сравнению с установленными в сосновых насаждениях естественного происхождения эксплуатационных лесов (таблица). Возможно, увеличение параметров гетерозиготности с увеличением возраста насаждения происходит за счет отбора в ходе онтогенеза в пользу гетерозиготных деревьев. В работах некоторых российских и польских ученых приводятся данные о нарастании средней наблюдаемой гетерозиготности с возрастом насаждения [14, 15, 16]. Однако исследования, проведенные Камаловой с соавторами, по сопоставлению параметров генетической изменчивости взрослых насаждений сосны обыкновенной (более 120 лет) и производных насаждений естественного возобновления на гарях и вырубке (от 20 до 45 лет) показали, что уровень наблюдаемой гетерозиготности у дочерних насаждений выше и разница составляет примерно 4% [17]. Не исключено, что такие различия связаны с условиями произрастания исследованных насаждений и влиянием различных негативных факторов (например, значительные техногенные загрязнения, изменение почвенно-климатических условий, гидрологического режима и т. д.), однако выяснение данного вопроса требует дополнительных исследований.

Заключение. В ходе молекулярно-генетического анализа получены новые данные о состоянии плюсового генофонда сосны обыкновенной из Беларуси. На основании проведенных исследований плюсовых насаждений установлено, что в среднем уровень их генетического разнообразия (ожидаемая гетерозиготность (H_e) = 25,0%; наблюдаемая гетерозиготность (H_o) = 25,6%) достоверно превышает таковой, установленный в целом для вида сосны обыкновенной в Беларуси (H_e = 24,0%; H_o = 24,7%) ($t = 2,77$ при $P < 0,01$ для H_e ; $t = 2,49$ при $P < 0,05$ для H_o). При этом в 12 проанализированных плюсовых насаждениях уровень генетической изменчивости соответствует и даже несколько выше такового, установленного в сосновых насаждениях естественного происхождения эксплуатационных лесов, и только в двух – достоверно ниже.

Значения коэффициентов подразделенности F_{ST} и G_{ST} плюсовых насаждений (0,011 и 0,014 соответственно) свидетельствуют о том, что их генетическая структура в целом однородна, и менее 1,5% всей генетической изменчивости приходится на межпопуляционное разнообразие. Среднее значение D_N для исследованных плюсовых насаждений составило 0,006.

Полученные результаты показывают, что в ходе популяционного семеноводства, основанного на массовом отборе (отбор лучших, плюсовых насаждений), одновременно с повышением продуктивности создаваемых лесных

культур может обеспечиваться и сохранение видового генофонда. В то же время необходимо отметить, что получение объективных сведений о степени воспроизводства генетического разнообразия вида на создаваемых лесосеменных объектах возможно лишь при обязательном проведении наряду с селекционной оценкой деревьев и насаждений, базирующейся на фенотипических признаках, их генетической инвентаризации, учитывающей также генотипическую компоненту. Внедрение в практику лесного хозяйства генетического мониторинга объектов постоянной лесосеменной базы позволит оптимизировать мероприятия по воспроизводству лесов и селекционному семеноводству для сохранения генофондов древесных видов в последующих поколениях.

Литература

1. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю. П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 619 с.
2. Sulkowska M. K. Isoenzyme analyses tools used long time in forest science [Электронный ресурс] / InTech – Open Access Company. 2012. URL: <http://dx.doi.org/10.5772/45756> (дата обращения: 27.03.2013).
3. Падутов В. Е. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. 144 с.
4. Санников С. Н., Петрова И. В. Дифференциация популяций сосны обыкновенной. Екатеринбург: УрО РАН, 2003. 247 с.
5. Устойчивое лесопользование и лесопользование. Лесное семеноводство. Общие требования: СТБ 1709-2006 / Гос. комитет по стандартизации Респ. Беларусь. Минск, 2007. 20 с.
6. Барсукова Т. Л., Щеголихина О. В. Селекция: практическое руководство для студентов специальности «Лесное хозяйство» / М-во образования Респ. Беларусь, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. Гомель: ГГУ им Ф. Скорины, 2009. 71 с.
7. Cheliak W. M., Pitel J. A. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species. Ottawa: Canadian Forestry Service, 1984. 49 p.
8. Рекомендации по генетической инвентаризации объектов лесосеменной базы и их использованию: утв. М-вом лесного хоз-ва Респ. Беларусь 06.03.12. Минск, 2012. 50 с.
9. Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Потенко В. В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: Полеспечать, 1989. 164 с.
10. Плохинский Н. А. Биометрия. М.: МГУ, 1970. 367 с.
11. Гончаренко Г. Г., Силин А. Е. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири. Минск: Тэхналогія, 1997. 191 с.
12. Шигапова А. И., Шигапов З. Х. Генетическое разнообразие популяций сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. // Вестник ОГУ. 2009. № 6. С. 445–447.
13. Новиков П. С., Шейкина О. В. ISSR-анализ деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) различных селекционных категорий // Научный журнал КубГАУ. 2012. № 82 (08). С. 100–112.
14. Генетическая изменчивость сосны обыкновенной в возрастных группах / Н. В. Старова [и др.] // Генетика. 1990. Т. 26, № 3. С. 498–505.
15. Политов Д. В., Белоконь М. М., Белоконь Ю. С. Динамика аллозимной гетерозиготности в дальневосточных популяциях кедрового стланика *Pinus pumila* (Pall.) Regel: сравнение зародышей и материнских растений // Генетика. 2006. Т. 42, № 10. С. 1348–1358.
16. Kosinska J. Lewandowski A., Chalupka W. Genetic variability of Scots Pine Maternal Populations and Their Progenies // *Silva Fennica*. 2007. Vol. 41, № 1. P. 5–12
17. 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.

Поступила 16.01.2014