

УДК 575.1:630*165.3

С. И. Ивановская, научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СОСНОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ
ПОЛЕССКОГО ЛЕСОСЕМЕННОГО РАЙОНА
НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

На основе метода электрофоретического анализа изоферментов проведены исследования насаждений сосны обыкновенной из Полесского лесосеменного района. Выявлено, что формирование генетической структуры сосновых насаждений происходит в зависимости от условий произрастания; из проанализированных насаждений наибольшим запасом генетического разнообразия обладают сосняки черничные; насаждения сосны обыкновенной из Беловежской пушчи имеют значительно больший генетический потенциал, чем насаждения сосны из эксплуатационных лесов. В ходе исследования лесосеменных плантаций установлено, что средняя ожидаемая гетерозиготность 43% исследованных лесосеменных плантаций достоверно ниже таковой, рассчитанной для природных популяций сосны обыкновенной из Беларуси.

Scots pine stands occurring in the Polesye seed region were investigated by isozyme electrophoresis. It is found that genetic structures of the stands depend on sites, amongst the stands studied the highest amount of genetic diversity occurs in *Pineta myrtillosa*, and the Scots pine stands located in Belovezhskaya Puscha have still greater genetic potential than Scots pine commercial forests. The study made it apparent that mean expected heterozygosities in 43% of the seed orchards studied are significantly lower than those calculated for natural stands of Scots pine from Belarus.

Введение. Способность живых организмов адаптироваться к изменениям окружающей среды через естественный отбор основана на генетической изменчивости [1]. Особи каждого вида содержат тысячи генов, комбинации этих генов изменяются от одного региона к другому, от популяции к популяции и даже от растения к растению. Как было показано в многочисленных исследованиях, нет двух организмов, абсолютно одинаковых по своему генотипу. Именно это явление лежит в основе генетического разнообразия. Популяции с низким уровнем генетической изменчивости более восприимчивы к заболеваниям, загрязнению, изменению климата, разрушениям местообитаний вследствие человеческой деятельности или воздействия других негативных факторов [1]. Неспособность адаптироваться к изменениям окружающей среды увеличивает риск вымирания.

Генетическая изменчивость прослеживается у большинства видов на всех уровнях организации и наблюдения (морфологическом, физиологическом, биохимическом и т. д.) [1]. Как отмечает ряд исследователей [1, 2], в популяциях существуют два типа генетической изменчивости – адаптивная и нейтральная. Оба типа важны для эволюции и, следовательно, должны учитываться при сохранении генетических ресурсов. При сохранении генетических ресурсов, по мнению большинства исследователей, главная цель – сохранить как можно больше генетической изменчивости, которая найдена у изучаемого вида [1, 3–5], поскольку генетическое разнообразие является базисным компонентом биоразнообразия, а генетические ресурсы – потенциальным источником полезных генетических признаков.

К 80–90 годам на основе анализа изоферментных белковых маркеров удалось создать методы оценки популяционных генофондов различных видов, что позволяет приступать к разработке мероприятий по управлению их генетическими ресурсами.

Целью данной работы было определение уровня генетического разнообразия насаждений сосны обыкновенной из Полесского лесосеменного района.

Материалы и методы. Материал для исследований природных популяций был собран в 13 насаждениях сосны обыкновенной, произрастающих в Восточном и Западном подрайонах Полесского лесосеменного района, из них 11 относятся к основным для Беларуси типам сосняков (черничные, мшистые и вересковые) (рис. 1).

Кроме того, был проведен анализ 21 лесосеменной плантации (ЛСП) второго порядка. Всего было исследовано 34 насаждения сосны обыкновенной. В среднем проанализировано около 100 деревьев из каждого насаждения.

Исследования проводили на основе метода электрофоретического анализа изоферментов. В качестве экспериментального материала использовались диплоидные ткани почек. Для гомогенизации и выделения ферментов применялся экстрагирующий буфер для вегетативных тканей [6].

Электрофоретическое фракционирование изоферментов проводили в 13–14%-ном крахмальном геле с использованием трех буферных систем: трис-ЭДТА-боратная, pH 8,6; трис-цитратная, pH 6,2; трис-цитрат/NaOH-боратная, pH 8,65 [7] с небольшими модификациями.

Гистохимическое окрашивание ферментов производилось по стандартным методикам, описанным в ряде руководств [6, 7]. Каждое дерево исследовалось по 11 ген-ферментным системам. Анализ проводили на основе 20 изоферментных локусов.



Рис. 1. Карта взятия выборок

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

Достоверность различий показателей средней гетерозиготности определялась на основании коэффициента Стьюдента [9]:

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

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

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

Аллельные частоты, полученные для исследованных насаждений, имеют сходные значения, и различия не превышают 20,0%, за исключением отдельных популяций по локусам Dia-1 и Aat-3, где различия в аллельных частотах достигают 30%. Выявленные различия в аллельных частотах между природными популяциями, произрастающими в различных лесорастительных условиях, соответствуют полученным ранее для насаждений сосны естественного происхождения [8].

На основе полученных аллельных частот для проанализированных насаждений были рассчитаны показатели генетического разнообразия, которые представлены в таблице.

Как следует из таблицы, доля полиморфных локусов по 95%-ному критерию (P_{95}) варьирует от 55 до 65%, по 99%-ному критерию (P_{99}) этот показатель выше и находится в пределах от 75 до 90%. Анализ значений средней ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности показал, что различия между показателями гетерозиготности отдельных насаждений достигают 4–5%. Исходя из полученных значений ожидаемой гетерозиготности H_e (основной параметр уровня генетического разнообразия, который не зависит от размеров выборки) и наблюдаемой гетерозиготности H_o можно сказать, что наибольшие значения уровня генетического полиморфизма характерны для сосняков черничных ($H_e = 24,5\%$, $H_o = 26,2\%$). Исследованные сосняки мшистые из Полесского лесосеменного района имеют наибольший уровень аллельного разнообразия ($A = 3,4$), однако данный параметр в большой степени зависит от размеров выборки. Наименьшие значения всех изученных показателей были выявлены у сосняков вересковых.

Значения основных показателей генетической изменчивости у деревьев сосны обыкновенной из разных типов леса (Полесский лесосеменной район)

Насаждения	Доля полиморфных локусов		Число аллелей на локус*		Средняя гетерозиготность*	
	P_{95}	P_{99}	$A > 0\%$	$A > 1\%$	H_e	H_o
Сосняки черничные	0,550	0,800	$2,900 \pm 1,165$	$2,250 \pm 0,910$	$0,245 \pm 0,007$	$0,262 \pm 0,007$
Сосняки мшистые	0,650	0,900	$3,400 \pm 1,046$	$2,550 \pm 0,999$	$0,245 \pm 0,005$	$0,246 \pm 0,005$
Сосняки вересковые	0,550	0,750	$2,850 \pm 1,040$	$2,150 \pm 0,875$	$0,224 \pm 0,007$	$0,228 \pm 0,007$
Среднее для природных популяций Беловежской пуши	0,650	0,950	$3,100 \pm 0,915$	$2,550 \pm 0,759$	$0,260 \pm 0,006$	$0,276 \pm 0,006$
В целом по виду	0,600	0,800	$3,600 \pm 1,095$	$2,350 \pm 0,988$	$0,240 \pm 0,002$	$0,247 \pm 0,002$

* Значения показателей приведены с ошибкой среднего.

В ходе изучения пяти насаждений сосны обыкновенной из Беловежской пуши было выявлено, что частоты встречаемости аллельных вариантов проанализированных изоферментных генов имеют сходные значения для всех исследованных насаждений – это говорит о большом сходстве их генетических структур. В исследованных насаждениях было установлено наличие широкого спектра полиморфизма среди изученных генов, все проанализированные гены были полиморфными, причем половина генов с высоким уровнем гетерозиготности (более 20%). Выявлено, что проанализированные сосновые насаждения Беловежской пуши имеют уровень генетического разнообразия, который соответствует верхнему пределу генетической изменчивости для белорусских сосняков, поскольку ожидаемая гетерозиготность (H_e) варьирует от 25,3 до 26,4%, в среднем составляя 26,0%, наблюдаемая гетерозиготность (H_o) – от 27,5 до 28,0%, в среднем составляя 27,6% (таблица).

Таким образом, на основе проведенных анализов можно сделать вывод о том, что исследованные насаждения сосны обыкновенной в Беловежской пуше обладают высоким уровнем генетической изменчивости, достоверно отличающимся от усредненных значений для насаждений естественного происхождения, произрастающих на территории Беларуси (для средней гетерозиготности $t \geq 3,162$). Сравнительный анализ полученных данных по уровню генетической изменчивости сосновых насаждений из Беловежской пуши и природных популяций из эксплуатационных лесов позволяет сделать вывод о том, что в ходе эксплуатации лесов происходит постепенное снижение уровня средней гетерозиготности.

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 из Полесского лесосеменного района (для основных типов сосняков Беларуси), которая представлена на рис. 2.

Исходя из структуры дендрограммы прослеживается некоторая особенность в кластеризации насаждений. Сосняки вересковые и черничные обособляются в отдельные достаточно тесные кластеры. Это говорит о сходстве генетических структур насаждений, объединенных типом лесорастительных условий независимо от пространственного расстояния между ними. Выявленную закономерность формирования генетической структуры сосновых насаждений в зависимости от типа леса следует учитывать

при создании лесосеменных плантаций сосны обыкновенной, т. е. оно должно осуществляться на лесотипологической основе.

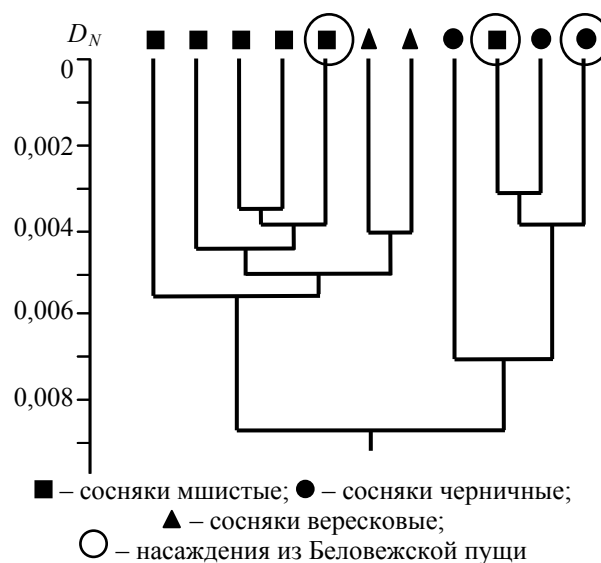


Рис. 2. Лесотипологическая дифференциация *P. sylvestris* в Полесском лесосеменном районе

Проведенные нами исследования позволили выявить генетические параметры, которые дают возможность определять потенциальную устойчивость или неустойчивость создаваемых лесных культур к неблагоприятным факторам среды. В ходе анализа кандидатов в элиту сосны обыкновенной нами было установлено, что средняя гетерозиготность, рассчитанная для этих деревьев, достоверно превышает значения средней гетерозиготности у нормальных деревьев, взятых из насаждений естественного происхождения [10]. Следовательно, все лесосеменные плантации второго порядка должны по этому параметру статистически достоверно превышать средние значения для природных популяций. Однако исходя из полученных данных только 57% ЛСП имеют уровень средней гетерозиготности, превышающий или равный выявленному для природных популяций, а 43% имеют достоверно более низкий уровень изменчивости, чем в среднем для вида сосны обыкновенной в Беларуси (рис. 3).

Генетическая инвентаризация, проведенная для лесосеменных плантаций второго порядка, показала, что это связано с большим количеством ошибок в ходе создания лесосеменных плантаций, приводящих к снижению эффективности использования ЛСП. Кроме того, как показали наши исследования, ошибки начинают накапливаться еще раньше, на этапе создания архивов клонов плюсовых деревьев, где в дальнейшем заготавливаются черенки для создания лесосеменных плантаций [11].



Рис. 3. Распределение исследованных лесосеменных плантаций сосны обыкновенной по уровню генетической изменчивости

Также ошибки могут возникать и на этапе прививания саженцев. Следовательно, для того чтобы использование ЛСП в лесном семеноводстве было действительно эффективным, а создаваемые из их семян лесные культуры сочетали наилучшие качества, как по продуктивности, так и по генетическим параметрам, необходимо организовать генетический контроль на всех этапах закладки лесосеменных плантаций. Главным образом, такая работа требует проведения генетической паспортизации плюсовых деревьев и генетической инвентаризации архивов клонов и маточных плантаций.

Заключение. В ходе молекулярно-генетического анализа получены новые данные о состоянии генофонда сосны обыкновенной из Полесского лесосеменного района. Выявлено, что формирование генетической структуры сосновых насаждений происходит в зависимости от условий произрастания; из проанализированных насаждений наибольшим запасом генетического разнообразия обладают сосняки черничные; насаждения сосны обыкновенной из Беловежской пушчи имеют значительно больший генетический потенциал, чем насаждения сосны из эксплуатационных лесов. Исследование лесосеменных плантаций второго порядка показало, что средняя ожидаемая гетерозиготность 43% исследованных ЛСП достоверно ниже таковой, рассчитанной для деревьев сосны обыкновенной из природных популяций Беларуси.

Литература

1. Айала, Ф. Современная генетика / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М.: Мир, 1988. – Т. 3. – 336 с.

2. Ledig, F. T. The conservation of diversity in forest trees / F. T. Ledig // *Bioscience*. – 1988. – Vol. 38. – P. 471–479.

3. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности / М. Кимура. – М.: Мир, 1985. – 396 с.

4. Frank, G. Protection of species diversity in forest / G. Frank // *Conservation and management of forest genetic resources in Eastern Europe I. Conservation, evaluation, management and sustainable use of forest genetic resources: Proceedings of the International training programme, Gmunden, 30 April – 11 May 2001 / Austrian Training Centre*. – Gmunden, 2001. – P. 101–135.

5. Koch, G. Protected areas and their importance for conservation of genetic diversity / G. Koch // *Conservation and management of forest genetic resources in Eastern Europe I. Conservation, evaluation, management and sustainable use of forest genetic resources: Proceedings of the International training programme, Gmunden, 30 April – 11 May 2001 / Austrian Training Centre*. – Gmunden, 2001. – P. 138–146.

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. Гончаренко, Г. Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов, В. В. Потенко. – Гомель: Полеспечать, 1989. – 164 с.

8. Падутов, В. Е. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси / В. Е. Падутов. – Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2001. – 144 с.

9. Плохинский, Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. – М.: МГУ, 1970. – 367 с.

10. Использование молекулярно-генетических методов для инвентаризации лесных селекционных объектов / С. И. Ивановская [и др.] // *Генетика и селекция лесных древесных пород: сб. науч. тр. НИИЛГиС*. – Воронеж, 2008. – С. 43–51.

11. Ивановская, С. И. Молекулярно-генетическая идентификация клонов на архивно-маточной плантации сосны обыкновенной / С. И. Ивановская, Е. Н. Химченко, В. Е. Падутов // *От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям: материалы междунар. науч. конф., Гомель, 2–5 окт. 2007 г.* – Минск, 2007. – С. 36.

Поступила 07.03 2012