

С. И. Ивановская, науч. сотрудник; М. М. Барсукова, инженер;
Д. И. Каган, аспирант

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛСП БРЕСТСКОГО ПЛХО И ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

The evidence from the electrophoretic study of isozymes and RAPD loci has indicated that the level of genetic diversity in second generation seed orchards of *Pinus sylvestris* is reasonably high and is within the range of the level of genetic variation in natural populations. Using Nei's genetic distance coefficient we estimated the level of genetic differentiation among the stands studied. It has been found that differences among the seed-production areas and differences among *P. sylvestris* natural populations occurring in Belarus are about much the same.

Введение. Особую актуальность в настоящее время приобретает проблема сохранения биологического и генетического разнообразия. Основной целью сохранения лесных древесных видов является не просто создание минимальных условий для выживания, а сохранение популяций с генетическим разнообразием, достаточным для адаптации к стрессам окружающей среды. Сегодня очень большую роль в возобновлении лесов играет искусственное лесовосстановление. В соответствии со Стратегическим планом развития лесного хозяйства Беларуси [1] в 2015 г. искусственное лесовосстановление будет составлять 50% от объемов лесовосстановления. При этом 50% семян, необходимых для этого, будет собираться на лесосеменных плантациях. Поэтому уровень генетического разнообразия ЛСП приобретает первостепенное значение.

На всех стадиях селекционной работы как при создании таких плантаций, так и искусственном лесовосстановлении происходит отбор, в корне отличающийся от естественного, даже без специального вмешательства человека. Процесс отбора и вегетативного размножения немногих высокопродуктивных плюсовых деревьев, семей, гибридов различного происхождения может приводить к существенным ограничениям генетической изменчивости [2].

Для проведения лесовосстановления особое значение имеет использование высококачественных семян, для получения которых создаются лесосеменные плантации второго порядка, заложенные на основе элитных деревьев. Создаваемые на основе индивидуального фенотипического отбора ЛСП способствуют массовому внедрению в практику лесовыращивания ценных по продуктивности, качеству древесины, устойчивости к неблагоприятным условиям среды и другим селективируемым признакам биотипов лесных пород и рассматриваются как одна из наиболее эффективных форм организации лесного семеноводства. При этом необходимо, чтобы они обладали достаточно большим запасом генетической изменчивости.

Целью данной работы было определение уровня генетического разнообразия лесосемен-

ных плантаций второго порядка и их сравнение с уровнем генетического полиморфизма природных насаждений сосны обыкновенной.

Материалы и методы. Материал для исследования был взят с 610 деревьев на лесосеменных плантациях 2 порядка, заложенных в Кобринском и Барановичском лесхозах. И в одном, и во втором плантации разделены на несколько рядов расположенных блоков. В каждом блоке количество деревьев, взятых для анализа, составляло не менее 50. Для сравнения был взят материал со 176 деревьев *Pinus sylvestris*, произрастающих в природных популяциях Беларуси. В качестве экспериментального материала использовались диплоидные ткани почек и хвои.

Электрофоретический анализ изоферментов проводили в 13–14% крахмальном геле с использованием трех буферных систем: *трис*-ЭДТА-боратной pH 8,6, *трис*-цитратной pH 7,0 и *трис*-цитрат/NaOH-боратной pH 8,65 [3] с небольшими модификациями. Экстракция ферментов и их гистохимическое окрашивание велось по стандартным методикам, описанным в ряде руководств [3, 4]. Каждое дерево исследовалось по 11 ген-ферментным системам (аспаратаминотрансфераза – ААТ, алкогольдегидрогеназа – АДН, глутаматдегидрогеназа – GDH, глюкозофосфатизомераза – GPI, диафараза – DIA, изоцитратдегидрогеназа – IDH, лейцинаминопептидаза – LAP, малатдегидрогеназа – MDH, флюоресцентная эстераза – FL-EST, фосфоглюкомутаза – PGM, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа – 6-PGD), которые кодируются 20 локусами.

Для получения препаратов суммарной ДНК сосны обыкновенной использовали SDS-метод [5]. Измерение концентрации и степени чистоты препаратов ДНК производилось при помощи счетчика ДНК/РНК «GenQuant Pro» (фирма «Amersham») [6]. Амплификация ДНК проводилась с использованием коммерческих наборов (фирма «Sigma», «ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора»). Реакционная ПЦР-смесь имела следующий состав: ЮПЦР буфер (100 мМ Трис-HCl, pH 9,0; 500 мМ р-р KCl; 25 мМ р-р

MgCl₂) – 2,5 мкл; вода (MilliQ) – 19,8 мкл; смесь нуклеотидтрифосфатов (10 мМ р-р каждого) – 0,5 мкл; праймер (10 мМ р-р) – 1 мкл; ДНК-полимераза (5 ед./мкл) – 0,2 мкл; образец ДНК (20 нг/мкл) – 1 мкл.

В табл. 1 приведены, использованные для анализа RAPD-локусов праймеры и их температуры отжига.

Таблица 1

Праймеры, использованные для анализа RAPD-локусов, и их температуры отжига T_a

№ п/п	Название	Структура праймера, 5'–3'	T_a , °С
1	Oligo 6	CACGGCGAGT	38,3
2	Oligo 8	CGCCCCATT	45,9
3	Oligo 16	GCCCCTCGTC	40,3
4	Oligo 85	ATCGGTCGGTA	36,9
5	Oligo 98	GGGTAACGCC	36,7

Аmplification, электрофоретическое разделение продуктов амплификации и выявление ампликонов производилось по стандартным методикам [6, 7].

В данной работе был использован ряд статистических показателей, описывающих генетическую структуру популяций и уровень генетической изменчивости [3, 8].

Результаты и обсуждение. При проведении молекулярно-генетического анализа было установлено, что из 20 пр. анализированных изоферментных генов полностью мономорфными оказался 1 locus (IDH). Оставшиеся гены полиморфные и насчитывают 61 аллельный вариант. В природных популяциях, с которыми мы проводим сравнение в данной работе, нами выявлено 59 аллельных вариантов. Это говорит о том, что аллельное разнообразие на ЛСП Брестского ПЛХО соответствует таковому в природных насаждениях *Pinus sylvestris*. Интересно отметить, что при анализе сосны обыкновенной с использованием гаплоидных эндоспермов было выявлено 86 аллельных вариантов [9]. При анализе гаплоидной ткани у сосны обыкновенной было выявлено 14 «нулевых аллелей» (аллели, кодирующие неактивную форму фермента), которые на диплоидной ткани обнаружить практически невозможно, учитывая их невысокую частоту встречаемости (менее 5%). Такая большая разница в количестве обнаруженных аллелей может быть объяснена использованием для анализа разных тканей (гаплоидные эндоспермы и диплоидные почки).

На основе выявленных аллельных частот были рассчитаны показатели генетического разнообразия проанализированных плантаций, которые представлены в табл. 2. Для целей сохранения генетических ресурсов наиболее важ-

ны показатели среднего числа аллелей на locus и гетерозиготности. Первый параметр определяет уровень генетического разнообразия для совокупности деревьев, а второй – характеризует уровень генетического разнообразия, подходящий на одно дерево, поскольку показывает, сколько генов у одной особи представлено двумя различными аллельными вариантами. При этом гетерозиготность рассматривается как более точный показатель генетического разнообразия, так как в значительно меньшей степени, чем среднее число аллелей на locus, зависит от количества проанализированных деревьев.

Как видно из табл. 2, доля полиморфных locусов для лесосеменных плантаций Кобринского лесхоза колеблется от 0,55 до 0,70 по 95% критерию (P_{95}), и от 0,65 до 0,85 по 99%-ному критерию (P_{99}). Значения параметра, определяющего среднее число аллелей на locus A , варьируется от 2,050 до 2,300. Расчет средней ожидаемой H_e и наблюдаемой H_e гетерозиготности показал, что несколько более высокий уровень показателей наблюдается для ЛСП Кобринского лесхоза на плантации 1999 г. (0,239 и 0,261 соответственно), а наиболее низкий уровень выявлен на плантации 1995 г. (0,214 и 0,215 соответственно).

В ходе анализа генетической изменчивости на лесосеменных плантациях Барановичского лесхоза было выявлено, что доля полиморфных locусов варьируется от 0,55 до 0,65 по 95%-ному критерию и от 0,70 до 0,85 по 99%-ному. Параметр среднего числа аллелей на ген находится в пределах от 2,150 до 2,500. Наибольшие значения H_e и H_o были получены на плантации 1995 г. – 0,238 и 0,238 соответственно, а наименьшие на ЛСП 1995 г. – 0,207 и 0,204 соответственно.

Если сравнивать полученные показатели генетического разнообразия ЛСП второго порядка Брестского ПЛХО, полученные на основе изоферментного анализа, то следует отметить, что они не имеют существенных отличий от параметров генетического полиморфизма природных насаждений сосны обыкновенной.

В ходе проведения RAPD-анализа были использованы 12 locусов, которые содержат 24 различных аллельных варианта. Если рассматривать каждый блок плантации отдельно, то количество аллелей на них варьировалось от 21 до 23. Сходные результаты были выявлены и в природных насаждениях.

В табл. 3 представлены основные показатели генетического полиморфизма, рассчитанные на основе проведенного RAPD-анализа. Доля полиморфных locусов на плантациях колебалась от 0,750 до 0,833, а ожидаемая гетерозиготность – от 0,305 до 0,349, что соответствует данным, полученным для природных популяций.

Таблица 2

Параметры генетической изменчивости лесосеменных плантаций сосны обыкновенной 2 порядка Брестского ПЛХО на основе анализа 20 изоферментных локусов

Древостой	Доля полиморфных локусов		Число аллелей на локус А	Средняя гетерозиготность	
	P ₉₅	P ₉₉		ожидаемая H _e	наблюдаемая H _o
ЛСП Брестского ПЛХО					
Кобрин 1995 г.	0,600	0,850	2,250 ±0,716	0,214 ±0,011	0,215 ±0,010
Кобрин 1996 г.	0,550	0,750	2,250 ±1,118	0,229 ±0,011	0,241 ±0,011
Кобрин 1998 г.	0,550	0,650	2,050 ±0,887	0,221 ±0,011	0,225 ±0,011
Кобрин 1999 г.	0,600	0,700	2,150 ±1,137	0,239 ±0,011	0,261 ±0,011
Кобрин 2000 г.	0,700	0,750	2,300 ±1,081	0,220 ±0,012	0,222 ±0,012
По Кобринскому лесхозу в целом	0,550	0,800	2,800 ±1,105	0,227 ±0,005	0,232 ±0,005
Барановичи 1994 г.	0,550	0,700	2,150 ±0,875	0,207 ±0,010	0,204 ±0,010
Барановичи 1995 г.	0,650	0,800	2,500 ±1,100	0,238 ±0,010	0,238 ±0,010
Барановичи 1996 г.	0,650	0,700	2,450 ±1,146	0,228 ±0,011	0,227 ±0,011
Барановичи 1997 г.	0,600	0,700	2,350 ±0,988	0,226 ±0,011	0,231 ±0,011
Барановичи 1998 г.	0,550	0,750	2,400 ±0,995	0,218 ±0,011	0,220 ±0,011
Барановичи 1999 г.	0,550	0,850	2,450 ±0,945	0,233 ±0,011	0,221 ±0,011
По Барановичскому лесхозу в целом	0,550	0,800	2,850 ±1,089	0,228 ±0,004	0,224 ±0,004
В целом	0,600	0,750	3,050 ±1,050	0,229 ±0,003	0,228 ±0,003
Природные насаждения					
В целом	0,600	0,700	2,900 ±0,852	0,224 ±0,006	0,237 ±0,006

На основании коэффициентов генетической дистанции Неи D_N , полученных в результате изоферментного анализа, была установлена степень генетической дифференциации между всеми блоками исследованных лесосеменных плантаций. Средняя величина D_N для ЛСП Кобринского лесхоза составляет 0,005, для посадок Барановичского лесхоза – 0,004. Средняя величина D_N для всех исследованных блоков лесосеменных плантаций равняется 0,006. Такие различия примерно соответствуют различиям между природными популяциями сосны обыкновенной в Беларуси.

Коэффициент генетической дистанции Неи, рассчитанный исходя из данных RAPD-анализа, для лесосеменных плантаций Кобринского лесхоза варьируется от 0,011 до 0,071, в

среднем составляя 0,033. Коэффициент генетической дистанции Неи для лесосеменных плантаций Барановичского лесхоза находится в пределах от 0,001 до 0,087, что составляет в среднем 0,051.

Интересно отметить, что параметры уровня генетического разнообразия и генетической дистанции Неи, полученные на основе ДНК-маркеров, в несколько раз превышают данные, полученные с использованием изоферментного анализа, что объясняется спецификой двух различных методов. Изоферментный анализ позволяет выявлять различия только в экзонных участках ДНК. Эти участки реализуют заключенную в них информацию в ходе онтогенеза и подвергаются действию естественного отбора.

**Показатели полиморфизма по RAPD-локусам лесосеменных плантаций
сосны обыкновенной 2 порядка Брестского ПЛХО**

Древостой	Доля полиморфных локусов	Среднее число аллелей на локус	Ожидаемая гетерозиготность
ЛСП Брестского ПЛХО			
Кобрин 1995 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,318 ±0,170
Кобрин 1996 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,305 ±0,164
Кобрин 1998 г.	0,750	1,750 ±0,452	0,323 ±0,207
Кобрин 1999 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,326 ±0,208
Кобрин 2000 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,330 ±0,174
По Кобринскому лесхозу в целом	1,000	2,000 ±0,000	0,347 ±0,144
Барановичи 1994 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,342 ±0,187
Барановичи 1995 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,337 ±0,204
Барановичи 1996 г.	0,750	1,750 ±0,452	0,312 ±0,204
Барановичи 1997 г.	0,750	1,750 ±0,452	0,329 ±0,210
Барановичи 1998 г.	0,833	1,833 ±0,389	0,349 ±0,174
Барановичи 1999 г.	0,750	1,750 ±0,452	0,316 ±0,206
По Барановичскому лесхозу в целом	0,917	1,917 ±0,289	0,369 ±0,154
Природные популяции			
В целом	0,833	1,833 ±0,389	0,348 ±0,185

RAPD-анализ, в отличие от изоферментного, позволяет обнаружить различия и в экзонных, и в интронных (не несущих информационной нагрузки) фрагментах ДНК. Поэтому с помощью RAPD-анализа можно выявить больше изменчивости.

С использованием метода UPGMA на основании коэффициентов генетической дистанции Nei, рассчитанных исходя из данных как изоферментного, так и RAPD-анализа, были построены дендрограммы. Схематическое изображение дендрограмм представлено на рис. 1 и 2.

На рисунках хорошо видно, что исследованные насаждения объединяются в три отдельных кластера. Особенно четко это отражено на рис. 2, где изображена дендрограмма на основе RAPD-анализа. Теоретически насаждения на дендрограммах должны были расположиться хаотично, поскольку каждый блок ЛСП должен отличаться от другого своим уникальным набором клонов. Кластеризация, изображенная на рис. 1 и 2, могла произойти по нескольким причинам:

1) на ЛСП р различных годов посадки использовался набор плюсовых деревьев, очень сходный внутри каждого лесхоза, но разный между ними;

2) на ЛСП присутствует местный, весьма ограниченный посадочный материал.

Что касается первого пункта, то проверить реестр плюсовых деревьев на ЛСП Кобринского лесхоза не представляется возможным из-за отсутствия документации в лесхозе, а для ЛСП Барановичского лесхоза перекрытие одних и тех же плюсовых деревьев между отдельными блоками составляет от 2 до 16%. На второе предположение можно дать ответ только после проведения полной инвентаризации по выявлению непривитых деревьев.

Заключение. В ходе проведенного исследования было установлено, что у *P. sylvestris* на лесосеменных плантациях второго порядка Брестского ПЛХО параметры уровня генетического разнообразия находятся в пределах уровня генетического полиморфизма, выявленного в природных популяциях сосны обыкновенной

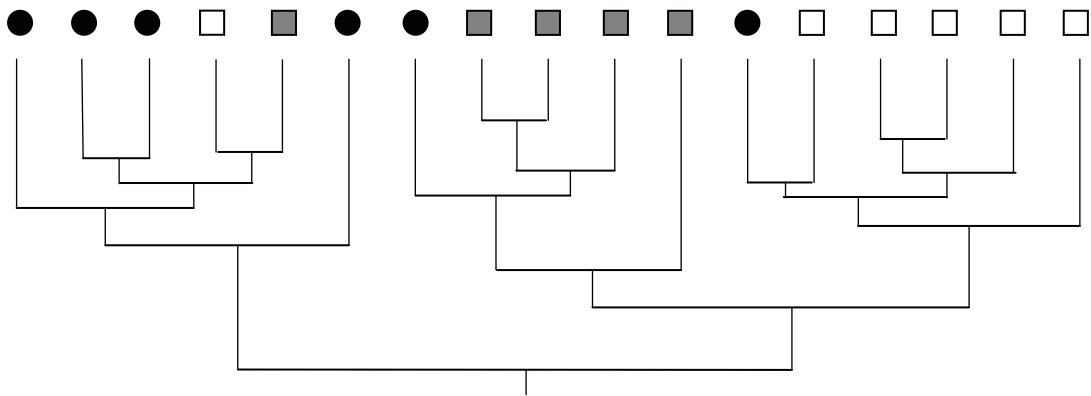


Рис. 1. Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации среди проанализированных насаждений на основании анализа изоферментных локусов:
 ■ – ЛСП Кобринского лесхоза □ – ЛСП Барановичского лесхоза, ● – природные насаждения

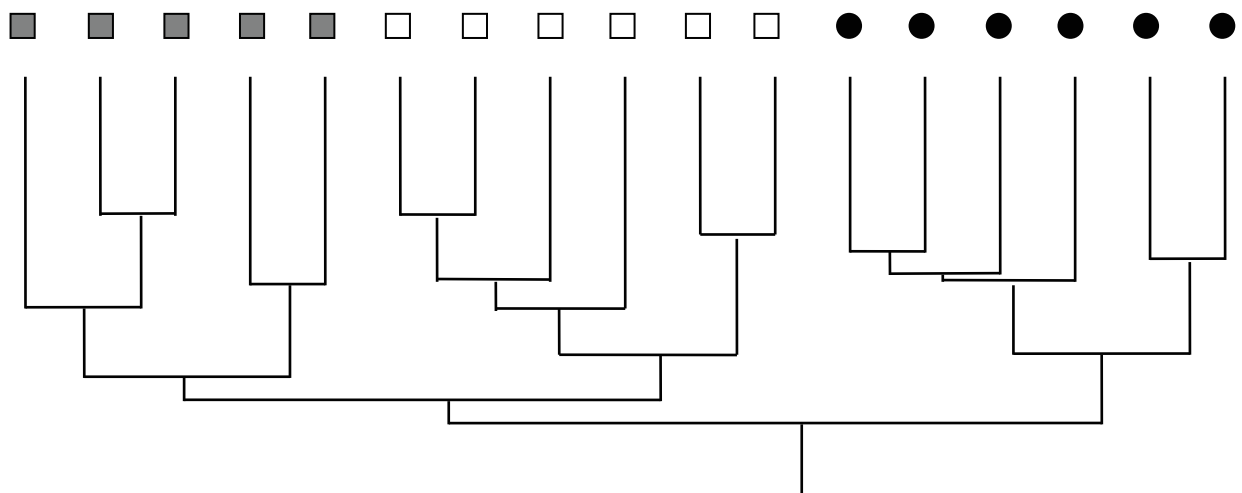


Рис. 2. Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации: среди проанализированных насаждений на основании анализа ДНК-локусов

■ – ЛСП Кобринского лесхоза □ – ЛСП Барановичского лесхоза ● – природные насаждения

в Беларуси. Степень генетической дифференциации между ЛСП соответствует различиям между природными популяциями сосны обыкновенной в Беларуси.

Литература

1. Стратегический план развития лесного хозяйства Беларуси. – Минск: МЛХ РБ, 1997. – 178 с.
2. Мамаев, С. А. О популяционном подходе в лесоводстве / С. А. Мамаев, Л.Ф. Семериков, А. К. Махнев // Лесоведение. – 1988. – № 1. – С. 3–9.
3. 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.
4. Cheliak, W. M. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Spe-

cies / W. M. Cheliak, J. A. Pitel. – Ottawa: Canadian Forestry Service, 1984. – 49 p.

5. Дорохов, Д. Б. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов / Д. Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33. – № 4. – С. 443–450.
6. Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual / T. Maniatis, J. Sambrook, E. F. Fritsch. – Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. – 324 p.
7. McCabe, P. C. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications / C. McCabe. – Academic Press, 1995. – P. 76–83
8. Гончаренко, Г. Г. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири / Г. Г. Гончаренко, А. Е. Силин. – Минск: Тэхнолоґія, 1997. – 191 с.
9. Падутов, В. Е. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси / В. Е. Падутов. – Гомель: ИЛ НАН Б, 2001. – 144 с.