

С. И. Ивановская, науч. сотрудник;
Е. Н. Химченко, техник ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ЛСП ВТОРОГО ПОРЯДКА ГОМЕЛЬСКОГО ПЛХО

The evidence from the electrophoretic study of isozymes has indicated that the level of genetic diversity in second generation seed orchards of *P. sylvestris* is reasonably high and is within the range of the level of genetic variation in natural populations. On the basis of the received results the basic parameters of a genetic variety for seed orchards are calculated, and their genetic inventory is lead. Also it has been established, that at *P. sylvestris* on seeds plantations of the second order of the Gomel forestcultures enterprises parameters of a level of a genetic variety are not the highest in comparison with natural plantings, however these parameters are within the limits of scope of values of a level of the genetic polymorphism revealed by us earlier in natural populations of a pine ordinary in Belarus. Also it has been revealed, that the percent of concurrence of quantity of clones according to the scheme on the trial area and the results received by us varies from 42,1 up to 87,1%.

Введение. В настоящее время естественная среда обитания претерпевает радикальные изменения в течение достаточно короткого периода времени вследствие воздействия комплекса неблагоприятных антропогенных факторов, поэтому особую актуальность приобретает проблема сохранения биологического и генетического разнообразия видов. В этой связи в лесном хозяйстве наиболее остро встает вопрос искусственного лесовосстановления. Так как одним из источников получения семян являются лесосеменные плантации, то уровень их генетического разнообразия должен быть достаточно высоким и максимально приближенным к уровню генетического полиморфизма природных популяций. Процесс отбора и вегетативного размножения немногих высокопродуктивных плюсовых деревьев, семей, гибридов различного происхождения может приводить к существенным ограничениям генетической изменчивости [1]. Кроме того, направленный искусственный отбор может изменять генетическую структуру и уровень генетической изменчивости, характерный для природных популяций [2–5]. Возникающие при этом затраты на поддержание продуктивности и устойчивости насаждений могут быть непомерно высокими, поскольку контролировать среду обитания в лесном хозяйстве несравненно сложнее, чем в сельскохозяйственном производстве.

Целью данной работы было определение уровня генетического разнообразия лесосеменных плантаций второго порядка и их инвентаризация на основе полученных генетических данных.

Материалы и методы. Материал для генетического анализа был собран с 498 деревьев *Pinus sylvestris* на лесосеменных плантациях второго порядка, которые находятся в Калинковичском, Петриковском и Мозырском лесхозах Гомельского ПЛХО. В качестве экспе-

риментального 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 [6] с небольшими модификациями. Экстракция ферментов и их гистохимическое окрашивание велось по стандартным методикам, описанным в ряде руководств [6, 7]. Каждое дерево исследовалось по 11 ген-ферментным системам (аспаратаминотрансфераза – ААТ, алкогольдегидрогеназа – АДН, глутаматдегидрогеназа – GDH, глюкозофосфатизомераза – GPI, диафороза – DIA, изоцитратдегидрогеназа – IDH, лейцинаминопептидаза – LAP, малатдегидрогеназа – MDH, флюоресцентная эстераза – FL-EST, фосфоглюкомутаза – PGM, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа – 6-PGD), которые кодируются 20 локусами.

В данной работе был использован ряд статистических показателей, описывающих генетическую структуру популяций и уровень генетической изменчивости [6, 8–11].

Результаты и обсуждение. При проведении молекулярно-генетического анализа было установлено, что из 20 проанализированных изоферментных генов полностью мономорфными оказались 3 локуса (IDH, MDH-1 и PGM-2). Оставшиеся 17 генов полиморфны и насчитывают 58 аллельных вариантов, что значительно ниже, чем в природных популяциях сосны обыкновенной, где было выявлено 86 аллельных вариантов [12]. Сходная ситуация была обнаружена при исследовании ели белой канадскими учеными [13]. Было показано, что у деревьев на лесосеменной плантации выявлено только 75% аллельных вариантов генов, присутствующих в природных популяциях.

Уменьшение количества выявленных аллелей в нашем исследовании может быть связано с тем, что из 86 аллелей в природных популяциях 28 оказались редкими (их частота составляет менее 1%), причем 15 из них были уникальными («частными»), так как встретились только в какой-либо одной из популяций. Кроме того, в природных популяциях были обнаружены 14 «нулевых» аллелей (аллели, кодирующие неактивную форму фермента), а выявление таковых аллелей на диплоидных тканях, используемых в данном исследовании, практически невозможно, так как они имеют довольно небольшую частоту встречаемости и гомозиготные по таким аллелям деревья очень редки.

Следует отметить, что различия в количестве выявленных аллелей связаны с теми аллельными вариантами, которые в белорусских природных популяциях имеют частоту менее 5%. Все аллели, встречающиеся с частотой более 5%, были обнаружены и на плантациях. Так же следует добавить, что наиболее часто встречающиеся аллели имели сходные частоты как в среднем у проанализированных плантаций, так и в обобщенной выборке природных популяций Беларуси [12].

В ходе проведения исследований для каждого проанализированного дерева был составлен генетический портрет и получены аллельные частоты для каждой отдельно взятой плантации. На основе выявленных аллельных частот были рассчитаны показатели генетического разнообразия проанализированных плантаций, представленные в табл. 1. Для целей сохранения генетических ресурсов наиболее важны показатели среднего числа аллелей на локус и гетерозиготности. Первый параметр определяет уровень генетического разнообразия для совокупности деревьев, а второй – характеризует уровень генетического разнообразия, приходящийся 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, поскольку в значительно меньшей степени, чем среднее число аллелей на локус, зависит от количества проанализированных деревьев.

Таблица 1

Значения показателей уровня генетической изменчивости сосны обыкновенной на лесосеменных плантациях II порядка в Гомельском ПЛХО

Год посадки ЛСП	Доля полиморфных локусов		Среднее число аллелей на локус	Средняя гетерозиготность	
	P ₉₅	P ₉₉		H _e	H _o
<i>Петриковский лесхоз</i>					
1992	0,550	0,650	2,105	0,239	0,251
1993	0,550	0,550	1,800	0,187	0,176
1994	0,550	0,600	1,800	0,214	0,247
1995	0,600	0,750	2,100	0,229	0,281
1996	0,500	0,550	1,650	0,204	0,224
В целом по лесхозу	0,550	0,700	2,450	0,222	0,229
<i>Калинковичский лесхоз</i>					
1993	0,500	0,600	2,100	0,205	0,209
1994	0,650	0,650	2,150	0,231	0,250
1995	0,550	0,700	2,000	0,187	0,197
1998	0,579	0,684	2,053	0,233	0,252
В целом по лесхозу	0,550	0,700	2,550	0,217	0,223
<i>Мозырский лесхоз</i>					
1997	0,500	0,700	2,300	0,219	0,238
Плантации в целом	0,650	0,750	2,850	0,231	0,233

Как видно из табл. 1, доля полиморфных локусов для лесосеменных плантаций Петриковского лесхоза колеблется от 0,50 до 0,60 по 95% критерию (P_{95}), и от 0,60 до 0,75 по 99% критерию (P_{99}). Значения параметра, определяющего среднее число аллелей на локус (A), варьируют от 1,650 до 2,105. Расчет средней ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности показал, что несколько более высокий уровень H_e и H_o наблюдается для ЛСП Петриковского лесхоза на плантации 1992 г. (0,239 и 0,251 соответственно), а наиболее низкий уровень обоих показателей выявлен на плантации 1993 г. (0,187 и 0,176 соответственно).

В ходе анализа генетической изменчивости на лесосеменных плантациях Калининковского лесхоза было выявлено, что доля полиморфных локусов варьирует от 0,50 до 0,65 по 95% критерию и от 0,60 до 0,70 по 99%. Параметр среднего числа аллелей на ген находится в пределах от 2,00 до 2,15. Наибольшие значения H_e и H_o были получены на плантации 1998 г. – 0,233 и 0,252 соответственно, а наименьшие – на ЛСП 1995 г. – 0,187 и 0,197 соответственно.

Если сравнивать полученные показатели генетического разнообразия в целом по лесхозам, то следует отметить, что значения доли полиморфных локусов не имели существенных отличий. Параметр среднего числа аллелей на локус был несколько ниже на ЛСП Мозырского лесхоза. Относительно небольшой размах значений также наблюдается по параметрам ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, поскольку H_e изменяется от 0,217 (Калининковский лесхоз) до 0,222 (Петриковский лесхоз), крайними величинами H_o являются 0,223 (Калининковский лесхоз) и 0,238 (Мозырский лесхоз).

Подводя итог анализа полиморфизма на лесосеменных плантациях второго порядка Гомельского ПЛХО, следует сказать, что в целом *P. sylvestris* на ЛСП обладает достаточно высоким запасом генетической изменчивости, поскольку у нее до 75% локусов находится в полиморфном состоянии, количество аллелей на локус достигает 2,85, а каждое дерево гетерозиготно по 23% своих генов. Кроме того, хотелось бы отметить следующее: показатели уровня гетерозиготности на лесосеменных плантациях, полученные нами, не являются самыми высокими в сравнении с таковыми у природных популяций сосны обыкновенной. Однако эти показатели находятся в пределах размаха значений уровня генетического полиморфизма, выявленного нами ранее в естественных насаждениях.

Интересно отметить, что немецкими учеными в ходе анализа лесосеменных плантаций сосны обыкновенной был обнаружен более низкий уровень полиморфизма по сравнению с

природными популяциями и подчеркивалась недостаточность использования только лесосеменных плантаций для целей сохранения генетического потенциала вида [14]. Анализ плантаций и природных популяций сосны ладанной так же выявил более низкий уровень генетического разнообразия на лесосеменных плантациях по сравнению с естественными насаждениями [15, 16].

Отдельно хотелось бы добавить, что для лесосеменных плантаций нами был проведен также RAPD анализ. Значения доли полиморфных локусов, полученные при помощи RAPD, не имели значительных отличий от величин, выявленных методом изоферментного анализа, в то время как показатели ожидаемой гетерозиготности несколько превышали таковые, полученные изоферментным методом.

На основе полученных молекулярно-генетических портретов потомков клонов (раметов), а также с использованием схем посадки плантаций, предоставленных нам лесхозами, была проведена инвентаризация исследованных лесосеменных плантаций, результаты которой представлены в табл. 2. В ходе проведения анализа было установлено, что наиболее высокий процент соответствия реестра клонов и реального присутствия определенных генотипов, исходя из полученных генетических данных, наблюдается на ЛСП Петриковского лесхоза и варьирует от 53,7 (1992 г. посадки) до 87,1% (1998 г. посадки). Наиболее низкие значения этого показателя были получены для лесосеменных плантаций Калининковского лесхоза – в пределах от 42,1 (1993 г. посадки) до 51% (1994 г. посадки). На ЛСП Мозырского лесхоза 63,7% из проанализированных деревьев можно назвать потомками различных клонов. Хотелось бы отдельно отметить, что в данном случае мы говорим не о соответствии схеме расположения клонов, а только об их наличии на плантации. Несоответствие реально полученных результатов реестру, приведенному в схемах, может быть обусловлено несколькими причинами: гибель прививки, отсутствие на схеме пометки о подсадке в случае гибели саженца, ошибка при прививке, ошибки при создании маточной плантации.

Ошибки при создании лесосеменных плантаций были отмечены и в других странах, причем такие ошибки могут быть разного рода. С одной стороны, это может быть просто несоответствие места расположения отдельных потомков клонов, т. е. оно отличается от разработанной схемы размещения клонов. С другой стороны, это может быть присутствие на плантации деревьев, генотипы которых отличаются от генотипов материнских деревьев, а следовательно, они не являются потомками представленных на плантации клонов.

Данные генетической инвентаризации

Год посадки ЛСП	Количество клонов (генотипов), представленных несколькими ракетами		Количество клонов (генотипов), представленных единичными ракетами		Совпадение реестра клонов согласно схеме на пробной площади и полученных результатов, %
	согласно схеме на пробной площади	фактически выявленных	согласно схеме на пробной площади	фактически выявленных	
<i>Калинковичский лесхоз</i>					
1993	14	10	5	38	42,1
1994	14	15	0	25	54,5
1995	16	10	0	23	50,0
1998	15	11	0	26	51,0
<i>Петриковский лесхоз</i>					
1992	15	10	0	19	53,7
1993	13	8	3	10	71,9
1994	9	7	7	14	75,0
1995	8	6	12	15	87,1
1996	3	2	6	8	83,3
<i>Мозырский лесхоз</i>					
1997	48	37	0	53	63,7

Присутствие в клоне чуждого ему генотипа было обнаружено группой генетиков под руководством Челяка при исследовании клонов ели белой на плантациях Национального лесного института (Онтарио, Канада) [17]. Исследователи отмечают, что изоферментный метод дает возможность своевременно обнаружить и сделать выбраковку случайных деревьев на плантациях, и не тратить впустую годы работы и деньги.

Молекулярно-генетические исследования потомков клонов, проведенные Адамсом на лесосеменной плантации «Бивер Крик», расположенной в штате Орегон, США, показали, что процент потомков, имеющих чуждый для клона генотип, составляет от 2 до 13, и только в четырех из девяти блоков не было обнаружено ошибок. Количество клонов, в которых обнаружены ошибки, варьирует от 8 до 24% [18].

Заключение. В ходе проведенного исследования было установлено, что у *P. sylvestris* на лесосеменных плантациях второго порядка Гомельского ПЛХО параметры уровня гене-

тического разнообразия не являются самыми высокими в сравнении с естественными насаждениями, однако эти показатели находятся в пределах размаха значений уровня генетического полиморфизма, выявленного нами ранее в природных популяциях сосны обыкновенной в Беларуси. Также было выявлено, что процент совпадения количества клонов согласно схеме на пробной площади и полученных нами результатов варьирует от 42,1 до 87,1%.

Литература

1. Мамаев, С. А. О популяционном подходе в лесоводстве / С. А. Мамаев, Л. Ф. Семериков, А. К. Махнев // Лесоведение: сб. науч. тр. / 1988. – № 1. – С. 3–9.
2. Brown, A. H. D. Isozymes and the genetic resources of forest trees / A. H. D. Brown, G. F. Moran // Conkle M. T. (ed) Proc. of the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects (July 27, 1979, Berkeley). USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep. PSW-48. – 1981. – P. 1–10.

3. Lundkvist, K. Genetic structure in natural and cultivated forest tree population / K. Lundkvist // *Silva Fennica*. – 1982. – V. 16. – P. 141–149.
4. Мелихов, И. С. Пути генетического улучшения лесных древесных растений / И. С. Мелихов. – М.: Наука, 1985. – 240 с.
5. Ledig, F. T. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems / F. T. Ledig // *Oikos*. – 1992. – V. 63. – P. 87–108.
6. 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.
7. 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.
8. Айала, Ф. Введение в молекулярную и эволюционную генетику / Ф. Айала. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
9. Айала, Ф. Современная генетика / Ф. Айала, Д. Кайгер. – М.: Мир, 1987. – 190 с.
10. Гончаренко, Г. Г. Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири / Г. Г. Гончаренко, А. Е. Силин. – Минск: Тэхналогія, 1997. – 191 с.
11. Гончаренко, Г. Г. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. – 197 с.
12. Генетические ресурсы сосны и ели в Беларуси. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. – 144 с.
13. Cheliak, W. M. Genetic effects of phenotypic selection in white spruce / W. M. Cheliak, G. Murray, J. A. Pitel // *For. Ecol. Manage.* – 1988. – V. 24. – P. 139–149.
14. Muller-Starck, G. Monitoring genetic variation in forest tree population / G. Muller-Starck, H. R. Gregorius // *Proc. 18th IUFRO World Congress (September 7–12, 1986, Ljubljana)*. – 1986. – Div. 2. – P. 589–599.
15. Adams, W. T. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: Clonal variation and frequency of of progeny due to self-fertilization / W. T. Adams, R. J. Joly // *Silvae Genet.* – 1980. – V. 29. – P. 1–4.
16. Conkle, M. T. Isozyme variation and linkage in six conifer species / M. T. Conkle (ed.). // *Proc. of the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects (July 27, 1979, Berkeley)*. USDA Forest Service, Gen. Tech. Rep. PSW-48. – 1981. – P. 11–17.
17. Cheliak, W. M. Genetics of the polycross. 1. Experimental results from Norway spruce / W. M. Cheliak, T. Skroppa, J. A. Pitel // *Theor. Appl. Genet.* – 1987. – V. 73. – P. 321–329
18. Adams, W. T. Application of isozymes in treebreeding / W. T. Adams // *Isozymes in plant genetics and breeding. Part. A*. Amsterdam: Elsevier, 1983. – P. 381–400.