

Обоснование показателей генетического разнообразия для лесосеменных плантаций сосны обыкновенной в Республике Марий Эл

О.В. Шейкина, к.с.-х.н., Ю.Ф. Гладков, аспирант, ФГБОУ ВО Поволжский ГТУ

О значимости генетического разнообразия как основы стабильности популяций в условиях изменяющейся окружающей среды говорится во многих работах [1, 2]. Также отмечается, что проблема сохранения генетического разнообразия не должна игнорироваться при реализации селекционных программ древесных видов. По мнению М. U. Stoehr и Y. A. El-Kassaby, если не быть достаточно осторожными, то уровень генетического разнообразия может быть снижен на этапе отбора по фенотипу, во время разных циклов селекции, а также непосредственно при получении семян и сеянцев [3]. При использовании в качестве источника семян лесосеменных плантаций (ЛСП) снижение генетического разнообразия может происходить из-за того, что используется ограниченное число плюсовых деревьев, а также из-за неравного распространения гамет клонами, отличающимися по урожайности. Поэтому на всех этапах селекционного процесса должен систематически выполняться мониторинг [4].

В отношении уже созданных лесосеменных плантаций мы сегодня в состоянии только констатировать существующее положение дел, иначе

говоря, можем оценивать уровень генетического разнообразия, не имея возможности что-либо изменить. Так, сравнительные оценки генетических параметров лесосеменных плантаций и природных популяций были проведены для сосны обыкновенной [5, 6], ели белой [7], ели обыкновенной [8], ели ситхинской [9] и др. Нужно отметить, что в этих исследованиях было показано, что отбор по фенотипу не всегда приводит к значительному снижению генетического разнообразия на лесосеменных плантациях, где уровень генетической изменчивости близкий или даже превышает показатели, характерные для природных популяций. Однако, на наш взгляд, полученные данные не снижают актуальности решения проблемы обеспечения высокого генетического разнообразия на вновь создаваемых ЛСП, особенно второго порядка, где после следующего цикла отбора будет представлено ещё более ограниченное число деревьев. В связи с этим необходимы исследования, дающие обоснование требований к генетической структуре будущих лесосеменных плантаций.

Одним из путей оценки генетического разнообразия является определение генетических параметров, таких, как доля полиморфных локусов, гетерозиготность, среднее число аллелей на локус, и ряда других, которые могут быть установлены с использованием

1. Характеристика объектов исследований

| Шифр | Месторасположение объекта | Таксационная характеристика | | | |
|------|---|-----------------------------|--------------|----------------------------|---------|
| | | состав | возраст, лет | тип леса | полнота |
| КЛ | Нежнурское участковое лесничество Килемарского лесничества, кв. 107 | 4С4С2Б | 85 | сосняк брусничный | 0,7 |
| МЛ | Комсомольское участковое лесничество Моркинского лесничества, кв. 19 | 10С | 45 | сосняк лишайниковый | 0,7 |
| УОЛ | Нолькинское участковое лесничество учебно-опытного лесхоза, кв. 77 | 9С1Б | 90 | сосняк брусничный | 0,9 |
| ПЛ | Старожильское участковое лесничество Пригородного лесничества, кв. 17 | 10С | 80 | сосняк лишайниково-мшистый | 0,75 |

различных типов молекулярных маркеров. Из множества молекулярных маркеров к наиболее доступным и достаточно информативным относятся ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats), которые успешно применяются в молекулярно-генетических исследованиях хвойных видов [6, 10].

Цель исследования заключалась в обосновании оптимальных значений генетических параметров для лесосеменных плантаций сосны обыкновенной в Республике Марий Эл, обеспечивающих сохранение генетического разнообразия на основе анализа полиморфизма ДНК с использованием ISSR-маркеров в спелых насаждениях.

Материал и методы исследования. Объектом исследований служили четыре насаждения сосны обыкновенной, произрастающие на территории Республики Марий Эл. Характеристика объектов исследований приведена в таблице 1.

В каждой популяции с 30 случайно отобранных деревьев были взяты образцы древесины с помощью особой высеки, из которых была выделена ДНК с использованием СТАВ-метода. Определение генетических параметров, характеризующих уровень генетической изменчивости, проводили на основе изучения полиморфизма шести ISSR-праймеров ((CA)₆RY; (CA)₆RG; (CA)₆(GT); (CA)₆(AC); (AG)₈T; (AG)₈YT). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе MJ MiniTM Gradient Thermal Cyler (Bio-Rad, США) по описанной ранее методике [6, 10].

Визуализацию ПЦР-продуктов проводили путём электрофореза в 1,5-процентном агарозном геле

в ТВЕ-буфере. Данные обрабатывали с использованием системы гель-документации GelDoc 2000 (Bio-Rad, США) и программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. ISSR-профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Для создания бинарной матрицы, характеризующей генетические профили исследуемых образцов, использовали программу BioImageGelesPCRAalysisv. 1.0. Математическую обработку данных проводили в среде POPGENE Version 1.32.

Результаты исследования. Для того чтобы лесосеменные плантации выполняли функцию сохранения и воспроизводства генетических ресурсов древесных видов, необходимо, чтобы совокупность потомств плюсовых деревьев на них по генетическим характеристикам была близкой к существующим на данный момент насаждениям. Для обоснования значений генетических параметров лесосеменных плантаций были изучены четыре насаждения сосны обыкновенной, произрастающие в различных частях района исследований. При этом принималось, что обобщённые данные могут отражать общий уровень генетического разнообразия сосновых популяций на территории Республики Марий Эл.

Наши исследования показали, что в целом для всех насаждений сосны обыкновенной 204 ISSR-локуса (94,9%) из 215 обнаруженных во всех насаждениях находятся в полиморфном состоянии, т.е. у них встречается два альтернативных варианта (рис.). Однако анализ данного показателя для каждого насаждения в отдельности говорит о том, что

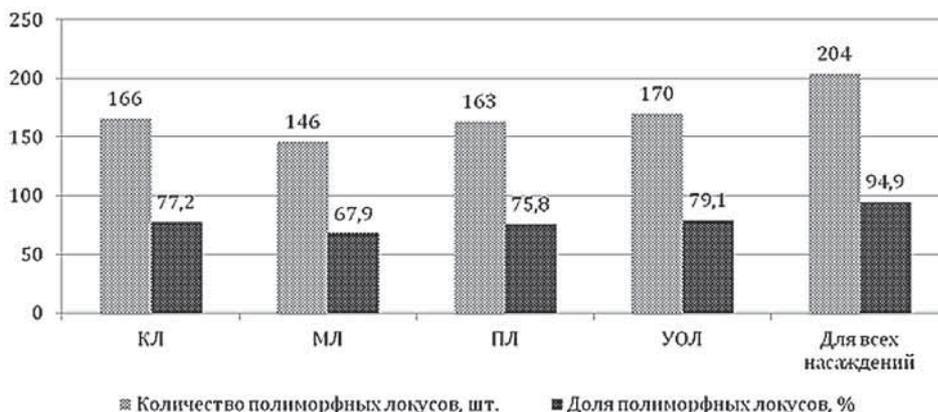


Рис. – Полиморфизм ISSR-маркеров в популяциях сосны обыкновенной Республики Марий Эл

2. Показатели генетического разнообразия насаждений сосны обыкновенной, вычисленных на основании полиморфизма ISSR-маркеров

| Насаждение | Показатель генетического разнообразия | | | |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---|-------------------|
| | наблюдаемое число аллелей, Na | эффективное число аллелей, Ne | разнообразие по Нею (ожидаемая гетерозиготность), H | индекс Шеннона, I |
| КЛ | 1,772 | 1,332 | 0,207 | 0,325 |
| МЛ | 1,679 | 1,289 | 0,182 | 0,287 |
| УОЛ | 1,791 | 1,321 | 0,205 | 0,326 |
| ПЛ | 1,758 | 1,279 | 0,174 | 0,277 |
| Для всех насаждений | 1,949 | 1,345 | 0,222 | 0,357 |

в них количество полиморфных локусов меньше общего значения и варьирует от 146 (67,9%) до 170 шт. (79,1%). Таким образом, по доле полиморфных локусов ни одно насаждение в отдельности не может обеспечить сохранность всех вариантов ISSR-локусов, встречающихся на территории республики.

На основе частоты встречаемости разных вариантов ISSR-маркеров в насаждениях были произведены расчёты показателей генетического разнообразия отдельно для каждого насаждения и в целом для всех насаждений (табл. 2). Наименьшее число вариантов аллелей было обнаружено в насаждении из Моркинского лесничества, где наблюдаемое число аллелей составило 1,679. Наибольшим разнообразием вариантов аллелей отличилось насаждение из учебно-опытного лесхоза, где данный показатель составил 1,791. В целом для всех насаждений было установлено, что на каждый ISSR-локус приходится 1,959 аллеля. Эффективное число аллелей варьирует у разных насаждений от 1,279 до 1,332 и составляет 1,345 в целом для вида на территории Республики Марий Эл.

Относительно высокими значениями ожидаемой гетерозиготности характеризуются ISSR-локусы в насаждениях из Килимарского лесничества и учебно-опытного лесхоза, у которых разнообразие по Нею составило 0,207 и 0,205 соответственно. Напротив, в насаждениях из Моркинского и Пригородного лесничеств в гетерозиготном состоянии находится только 18,2 и 17,4% ISSR-локусов. Для всех насаждений этот показатель составил 0,222.

По индексу Шеннона исследованные насаждения также различаются. Так, более высокие значения данного показателя характерны также для насаждений из Килимарского лесничества и учебно-опытного лесхоза (0,325 и 0,326 соответственно), а более низкие для Моркинского и Пригородного лесничеств (0,287 и 0,277 соответственно). В целом для всех насаждений индекс Шеннона составил 0,357.

Таким образом, исследования четырёх насаждений из разных частей Республики Марий Эл позволили определить значения параметров, характеризующих генетическую изменчивость сосны обыкновенной в данном регионе. В целом для сосны обыкновенной характерны следующие показатели генетического разнообразия: доля по-

лиморфных локусов 94,9%, наблюдаемое число аллелей – 1,949, эффективное число аллелей – 1,345, ожидаемая гетерозиготность – 0,222, индекс Шеннона – 0,357. Для обеспечения сохранности и воспроизводимости установленного уровня генетической изменчивости необходимо, чтобы плюсовые деревья на лесосеменных плантациях давали в совокупности значения параметров, не ниже установленных.

Выводы. 1. В исследованных насаждениях показатели генетического разнообразия варьировали в следующих пределах: доля полиморфных локусов от 67,9 до 79,1%, наблюдаемое число аллелей – от 1,679 до 1,791, эффективное число аллелей – от 1,279 до 1,332, ожидаемая гетерозиготность – от 0,174 до 0,207, индекс Шеннона – от 0,277 до 0,325.

2. Общая генетическая изменчивость сосновых популяций на территории Республики Марий Эл характеризуется следующими параметрами: доля полиморфных локусов – 94,9%, наблюдаемое число аллелей – 1,949, эффективное число аллелей – 1,345, ожидаемая гетерозиготность – 0,222, индекс Шеннона – 0,357. Только при условии, что лесосеменные плантации будут иметь значения генетических параметров не ниже установленных для вида в данном регионе, мы можем рассчитывать на сохранение существующего генетического разнообразия. При этом актуальным является определение количества плюсовых деревьев, которые способны обеспечить заданный уровень значений параметров генетического разнообразия. Таким образом, на основе полученных данных можно контролировать генетические параметры вновь создаваемых лесосеменных плантаций, приближая их к оптимальным. Решение этой задачи будет способствовать поддержанию внутривидового биоразнообразия в ходе искусственного лесовосстановления.

Литература

1. Ledig F.T. The conservation of diversity in forest trees // *Bioscience*. 1988. Vol. 38. P. 471–479.
2. Namkoong G. Biodiversity – issues in genetics, forestry and ethics // *Forestry Chronicle*. 1991. Vol. 68. P. 438–443.
3. Stoehr M.U., El-Kassaby Y.A. Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia // *Theor. Appl. Genet.* 1997. Vol. 94. P. 83–90.
4. El-Kassaby Y.A., Namkoong G. Genetic diversity of forest tree plantations: consequences of domestication // In: *Consequences of changes in biodiversity*. IUFRO World Congress, Tampere,

- Finland. 1995. Vol. 2. P. 218–228.
4. Гончаренко В.Е., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: Белорусский научно-исследовательский институт лесного хозяйства. 1989. 163с.
 5. Криворотова Т.Н., Шейкина О.В. Генетическая структура лесосеменных плантаций и насаждений сосны обыкновенной в Среднем Поволжье // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия «Лес. Экология. Природопользование». 2014. № 1. С. 77–86.
 6. Cheliak W.M., Murray G., Pitel, J. A. Genetic effects of phenotypic selection in white spruce // For. Ecol. Manage. 1988. Vol. 24. P. 139–149.
 7. Bergman F., Ruetz W. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations // For. Ecol. Manage. 1991. Vol. 46. P. 39–47.
 8. Chaisurisri K., El-Kassaby Y.A. Genetic diversity in a seed production population and natural population of Sitka spruce // Biodiv. Conserv. 1994. Vol. 3. P. 512–523.
 9. Милютин Т.Н., Шейкина О.В., Новиков П.С. Молекулярно-генетические исследования изменчивости клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* по ISSR-маркерам // Хвойные бореальной зоны. 2013. № 1–2. Т. XXXI. С. 102–105.