

УДК 630:575

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ БЕЛАРУСИ

© 2014 г. В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Д. И. Каган, О. А. Ковалевич,
М. Я. Острикова, С. В. Пантелеев, С. И. Ивановская, Д. В. Кулагин

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

Республика Беларусь, 246001, Гомель, ул. Пролетарская, 71

E-mail: forestgen@mail.ru, betula-belarus@mail.ru, quercus-belarus@mail.ru,

o-kovalevich@mail.ru, heterobasidion@mail.ru, stasikdesu@mail.ru,

isozyme@mail.ru, aqua32@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Представлены результаты молекулярно-генетических исследований, выполненных сотрудниками Института леса Национальной академии наук Беларуси. Приведены примеры их практического использования в лесном хозяйстве Беларуси.

Ключевые слова: молекулярная генетика, лесное хозяйство, плантационное и популяционное семеноводство, селекция, фитопатологический мониторинг, посадочный материал, Республика Беларусь.

В настоящее время методы молекулярной генетики и биотехнологии все шире применяются в лесном хозяйстве для оценки и мониторинга состояния лесных генетических ресурсов, управления процессами лесовосстановления, фитосанитарного мониторинга лесных насаждений и питомников, получения селекционного посадочного материала.

Плантационное семеноводство. Одной из основных задач лесного хозяйства является лесовосстановление и лесоразведение. В соответствии со «Стратегическим планом развития лесного хозяйства Беларуси» (1997) 50 % новых лесов должно создаваться за счет естественного лесовозобновления, а 50 % – путем искусственного лесовосстановления. Для создания лесных культур половина необходимого объема семян должна собираться в лучших насаждениях естественного происхождения (плюсовых и хозяйственных семенных насаждениях) и такое же количество – на лесосеменных плантациях (ЛСП). Необходимо отметить, что в Беларуси в отличие от других стран СНГ созданы не только ЛСП 1-го порядка (заложены с использованием плюсовых деревьев, отобранных по фенотипу в лесах), но и ЛСП 2-го порядка (заложены с использованием плюсо-

вых деревьев, чье потомство было протестировано в испытательных культурах и показало достоверное превосходство по продуктивности по сравнению с контролем).

Каждый этап селекционного семеноводства в лесном хозяйстве занимает большой промежуток времени, что связано с длительным жизненным циклом древесных растений. Так, например, анализ семенного потомства плюсовых деревьев можно проводить в испытательных культурах только в возрасте 30–40 лет. Поэтому актуальной проблемой является возможность правильной типировки семенного и посадочного материала, установления их происхождения от того или иного плюсового дерева. Ошибки, допущенные на первых этапах селекционной работы, можно будет распознать только через десятилетия. Поэтому одним из важных аспектов применения молекулярной генетики является генетическая паспортизация плюсовых деревьев с помощью различных методов анализа ДНК. Такие генетические паспорта заносятся в компьютерную базу данных, что позволяет проводить генетическую инвентаризацию селекционно-семеноводческих объектов, выбраковывая ошибочно посаженные деревья, и создавать модели схем смешения

плюсовых деревьев на лесосеменных плантациях (Ковалевич и др., 2010).

Особое значение проведение генетической инвентаризации имеет для архивных и маточных плантаций, где потомство от каждого плюсового дерева представлено в виде двух десятков индивидуумов (раметы), с которых проводится заготовка черенков для создания лесосеменных плантаций. Что же касается непосредственно ЛСП, то их генетический анализ необходим не столько для выбраковки отдельных деревьев, сколько для определения, в каких типах леса оптимально использовать семена, собранные на той или иной плантации. Это связано с тем, что условия произрастания оказывают влияние на формирование генетической структуры насаждений, и использование партий семян, не оптимизированных к определенным факторам внешней среды, приводит к снижению продуктивности и устойчивости создаваемых насаждений. Однако не все используемые в настоящее время ЛСП можно разделить на отдельные группы, поскольку схемы плантаций ранее создавались без учета генетических паспортов плюсовых деревьев. В настоящее время в Институте леса НАН Беларуси разработано компьютерное обеспечение моделирования генетической структуры ЛСП по любым генетическим параметрам (Ковалевич и др., 2010), и такие оптимизированные лесосеменные плантации создаются в Беларуси с 2009 г.

В лесном семеноводстве важной задачей является сохранение в создаваемых лесах уровня генетического разнообразия, характерного для вида, поскольку лесные культуры до возраста рубки (60–80 лет) испытывают влияние разнообразных факторов внешней среды. Чем больше генотипическое разнообразие насаждений, тем больше деревьев окажутся устойчивыми к различным неблагоприятным воздействиям. В то же время селекционный процесс приводит к обеднению генофонда в результате отбора и размножения небольшого числа наиболее продуктивных генотипов. В настоящее время благодаря наличию генетических паспортов на плюсовые деревья имеется возможность создавать ЛСП, которые обеспечат в будущих

насаждениях и повышение продуктивности, и сохранение устойчивости. Ранее для решения этих задач предусматривалось механическое увеличение числа плюсовых деревьев на плантациях. Генетическая инвентаризация и паспортизация 62 селекционно-семеноводческих объектов показала, что сохранение генетического разнообразия вида удастся обеспечивать на 65 % ЛСП 2-го порядка сосны обыкновенной, на 80 % – ЛСП 1-го порядка ели европейской, на 100 % – ЛСП 1-го порядка сосны обыкновенной и ЛСП 2-го порядка ели европейской.

Популяционное семеноводство. Кроме плантационного семеноводства в лесном хозяйстве активно развивается и второе направление – популяционное семеноводство. Это направление предусматривает отбор лучших насаждений естественного происхождения и использование их в качестве источника лесосеменного сырья для лесовосстановления. Однако необходимо знать, насколько широко можно использовать это лесосеменное сырье. После последнего оледенения лесные древесные виды распространялись на территорию Беларуси по различным миграционным путям и из разных рефугиумов, где они адаптировались к определенным почвенно-климатическим условиям. Все это оказывает влияние на современную популяционную структуру лесных видов, что выявлено на примере дуба черешчатого. Проведенный нами анализ 150 дубрав из всех районов Беларуси показал, что на территории республики можно выделить пять метапопуляций, или популяционных систем, которые мигрировали из двух балканских рефугиумов. Установлено, что географическое распространение этих метапопуляций в Беларуси носит неслучайный характер и определяется совокупным влиянием трех факторов: степенью континентальности климата, высотой над уровнем моря и типом условий местопроизрастания. Каждая метапопуляция адаптирована к определенному сочетанию этих факторов, и это необходимо учитывать при лесовосстановлении. На основании проведенных исследований для дуба черешчатого разработано новое лесосеменное районирование, регламентирующее перенос лесосе-

менного и посадочного материала между лесхозами, созданы схемы размещения генетических резерватов и хозяйственных семенных насаждений (Рекомендации..., 2012). В настоящее время аналогичные работы проводятся для сосны обыкновенной и ели европейской.

Селекция. За последнее десятилетие благодаря полному или частичному секвенированию геномов различных растительных видов достигнуты определенные результаты в области идентификации генов и их комплексов, ответственных за проявление хозяйственно ценных признаков. Определение генетической детерминации хозяйственно ценных признаков лесных древесных пород является весьма актуальным в ходе реализации селекционных мероприятий, направленных на увеличение продуктивности и устойчивости насаждений, рациональное использование лесных ресурсов.

Одними из хозяйственно важных признаков, по которым проводится селекция хвойных пород в Беларуси, являются показатели смолопродуктивности и физико-механических свойств древесины. В ходе проведенных исследований сосны обыкновенной и ели европейской были выявлены и секвенированы гены, кодирующие ферменты биосинтеза терпеновых масел (смолопродуктивность): 3-каренсинтетазу, мирценсинтетазу, пиненсинтетазу, лимоненсинтетазу, и монолигнолов (лигнификация): циннамилалкогольдегидрогеназу, фенилаланинлиазу, 4-кумарат-КоА-лигазу, O-метилтрансферазу кофейной кислоты. У высокосмолопродуктивных форм сосен в генах, детерминирующих ферменты 3-каренсинтетазу, мирценсинтетазу, пиненсинтетазу, лимоненсинтетазу, установлено наличие формоспецифического полиморфизма. Аналогичные результаты получены для плюсовых деревьев сосны обыкновенной, у которых выявлен формоспецифический полиморфизм по генам, детерминирующим ферменты биосинтеза лигнина: O-метилтрансферазу кофейной кислоты и циннамилалкогольдегидрогеназу. Для ели европейской установлено, что деревья с пониженным содержанием лигнина по гену циннамилалкогольдегидрогеназы также харак-

теризуются формоспецифической изменчивостью. Все это позволило разработать методику ранней диагностики посадочного материала для выявления хозяйственно ценных саженцев.

Фитопатологический мониторинг. Инфекции растений представляют одну из наиболее актуальных проблем, связанных с выращиванием посадочного материала лесных древесных видов. Принципы диагностики инфекционных заболеваний с помощью методов ДНК-анализа сводятся к выявлению генетического материала патогена в тканях хозяина. Следует отметить, что диагностика только ДНК микроорганизмов в растениях не может в абсолютной мере свидетельствовать о наличии инфекционного процесса, поскольку мертвые клетки патогенов также содержат дезоксирибонуклеиновую кислоту и дают положительную реакцию в ходе молекулярно-генетических тестов. А вот выявление в образце матричной РНК возбудителей инфекции как продукта транскрипции генов однозначно указывает на присутствие активной патогенной микрофлоры. Однако в большинстве случаев молекулярно-фитопатологический анализ проводится на основании анализа ДНК-маркеров, что связано с большей чувствительностью метода и простотой выполнения исследований.

В настоящее время в Институте леса НАН Беларуси секвенированы видоспецифические фрагменты различных фитопатогенов, что позволило разработать методы молекулярной диагностики более 100 видов возбудителей. Для большинства фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания посадочного материала древесных видов в лесных питомниках, разработано пять альтернативных методов видовой идентификации: электрофоретический анализ амплифицированных локусов, рестрикционный анализ амплифицированных локусов, электрофоретический анализ терминальных рестрикционных фрагментов амплифицированных локусов, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с видоспецифическими праймерами, ПЦР в реальном времени с использованием видоспецифических зондов. Методы видовой идентификации возбудителей заболеваний используются в

системе Министерства лесного хозяйства РБ для фитосанитарного мониторинга 38 лесных питомников (Баранов и др., 2012).

Выращивание селекционного посадочного материала. Важной для лесопитомнического хозяйства является возможность получения селекционного посадочного материала в промышленных масштабах для создания плантационных культур целевого назначения: лесосырьевых, топливно-энергетических и т. д. Для этих целей в Институте леса НАН Беларуси адаптированы и оптимизированы для аборигенных лесных видов технологии их микроклонального размножения (Технологический регламент..., 2011; Лабораторный регламент..., 2011; Методические рекомендации..., 2013), которые используются в Республиканском лесном селекционно-семеноводческом центре Министерства лесного хозяйства РБ. В настоящее время в коллекции *in vitro* представлено более 100 клонов 25 лесных растительных видов. Одной из проблем технологии микроклонального размножения является выращивание из микрорастений посадочного материала, пригодного для создания лесных культур. Особую роль в этом играет адаптация растений, полученных в стерильных условиях, к выращиванию в нестерильных почвенных субстратах. Проведенные исследования показали эффективность использования в условиях лесных питомников таких бактериальных препаратов, разработанных Институтом микробиологии НАН Беларуси, как «Фрутин», «Гордебак» и «Бактопин» (Сафронова и др., 2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баранов О. Ю., Ярмолович В. А., Пантелеев С. В., Куприенко Д. Г. Молекулярно-генетическая диагностика грибных болезней

в лесных питомниках // Лесн. и охотн. хоз-во. 2012. № 6. С. 21–29.

Ковалевич А. И., Падутов В. Е., Сидор А. И. и др. Лесные культуры // Генетические основы селекции растений: в 4 т. Т. 2. Частная генетика растений / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. Минск, 2010. Гл. 11. С. 539–573.

Лабораторный регламент микроклонального размножения видов рода Тополь: утв. М-вом лесного хоз-ва Респ. Беларусь 27.12.11. Минск, 2011. 9 с.

Методические рекомендации по введению в культуру *in vitro* лиственных древесных пород (березы повислой, березы пушистой, ольхи черной, липы мелколистной, клена остролистного): утв. М-вом лесного хоз-ва Респ. Беларусь 30.12.13. Минск, 2013. 33 с.

Рекомендации по сохранению и рациональному использованию генофонда и развитию ПЛСБ дуба черешчатого: утв. М-вом лесного хоз-ва Респ. Беларусь 06.03.12. Минск, 2012. 19 с.

Сафронова Г. В., Алещенко З. М., Мельникова Н. В. и др. Стимуляция роста лесного посадочного материала с открытой корневой системой азотфиксирующими и фосфатмобилизирующими ризобактериями // Биотехнология: состояние и перспективы развития: мат-лы VII Московского Междунар. конгресса. Ч. 1. М., 2013. С. 359–360.

Стратегический план развития лесного хозяйства Беларуси / М-во лесного хоз-ва Респ. Беларусь, Ин-т леса НАН Беларуси. Минск: БГТУ, 1997. 177 с.

Технологический регламент микроклонального размножения дуба черешчатого: утв. М-вом лесного хоз-ва Респ. Беларусь 27.12.11. Минск, 2011. 11 с.

Application of Molecular Genetic Methods for Forestry in Belarus

**V. E. Padutov, O. Yu. Baranov, D. I. Kagan, O. A. Kovalevich,
M. Ya. Ostriкова, S. V. Panteleev, S. I. Ivanovskaya, D. V. Kulagin**

*Institute of Forest, National Academy of Sciences of Belarus
Proletarskaya str., 71, Gomel, 246001 Republic of Belarus*

E-mail: forestgen@mail.ru, betula-belarus@mail.ru, quercus-belarus@mail.ru,
o-kovalevich@mail.ru, heterobasidion@mail.ru, stasikdesu@mail.ru,
isozyme@mail.ru, aqua32@mail.ru

The results of molecular genetic studies, carried out by researchers of the Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus are presented in the paper. Examples of their practical use in forestry of Belarus are shown.

Keywords: *molecular genetics, forestry, plantation and population seed growing, breeding, phytopathological monitoring, planting material, Republic of Belarus.*