

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ ПО ФОРМАМ ТРЕЩИНОВАТОСТИ КОРЫ НА ОСНОВЕ КАЧЕСТВЕННОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ

Е. В. Клещева

Воронежская государственная лесотехническая академия

Материалы статьи посвящены исследованию индивидуальной изменчивости березы повислой в ЦЧО по количественным и качественным признакам, биохимическим свойствам. Показана генетическая изменчивость форм по типу трещиноватости коры березы повислой по изоферментам белков лубяной ткани. Рассматривается вопрос об использовании генетических маркеров для идентификации березы повислой по формам трещиноватости коры.

ВВЕДЕНИЕ

Генетические маркеры играют исключительно важную роль в изучении наследственной конституции организма и особенно — в оценке исходного селекционного материала, поскольку облегчают контроль над включением желаемых генетических факторов от родительских форм в создаваемые сорта и гибриды. А также позволяют в раннем возрасте определить принадлежность растения к тому или иному виду, форме [1].

Изучение изоэнзимного полиморфизма, в отличие от фенотипической изменчивости признаков представляет определенные преимущества для анализа, так как полипептидная цепь белка энзима является непосредственным продуктом гена и намного меньше подвержена вторичным изменениям. Белки и ферменты находятся под контролем определенных генов, ферменты практически всегда экспрессируются кодоминантно. В том месте геля, где в результате электрофореза остановился фермент, происходит определенная химическая реакция, которую можно представить так:



По числу и расположению окрашенных фракций можно судить о генах, кодирующих данный фермент в клетках каждого образца [2].

Для генетической характеристики полусибсового потомства березы повислой в пределах форм по трещиноватости коры, по электрофоретическим свойствам их белков, нами проведены исследования качественного состава отдельных плюсовых

деревьев в пределах семей, различных по трещиноватости коры.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования послужили испытательные культуры березы повислой заложенные в 1979 г. в Животиновском лесничестве Учебно-опытного лесхоза ВГЛТА, в условиях перехода от простой свежей субори В₂ к сложной свежей субори С₂. Полусибсовое потомство березы повислой первого поколения представлено от 83 лучших и нормальных материнских деревьев различных по типу трещиноватости коры. Для определения генетической изменчивости изоформ пероксидазы, исследовано 120 лучших и нормальных деревьев полусибсового потомства березы повислой первого поколения, представленного 15 семьями в пределах 7 форм по типу трещиноватости коры

Выделение белков для получения изоформ пероксидазы, получения антисывороток и иммунохимических анализов проводили следующим образом. Лубяную ткань заготавливали в период замедленных физиолого-биохимических процессов у березы. Для энзимэлектрофореза лубяную ткань в количестве 1 г с каждого дерева, отдельно измельчали до гомогенной массы с 2 мл веронал ацетатного буфера рН-8,6, которую затем помещали в холодильную камеру при +5 °С в течение 1 часа. Надосадочную жидкость использовали для электрофоретического разделения белка. Лубяную ткань для получения антисывороток для иммунохимических исследований заготавливали в количестве 150 г с каждого дерева отдельно и заливали 10 % раствором хлористого натрия, забуферного дл рН7 в соотношении 1:3 с защитной добавкой сахарозы 100 мг/мл. В лабораторных условиях лубяную ткань измельчали до гомогенной массы при +2, +3 °С и заливали двумя частями 10% раствора

хлористого натрия. Затем гомогенат центрифугировали 30 минут при 6000 оборотах в минуту и ставили на диализ против дистиллированной воды в течение 72 часов, меняя воду 3 раза в сутки. Полученные растворы водорастворимых белков концентрировали в токе воздуха до нужного объема и использовали для приготовления специфичных антисывороток и иммунохимических анализов.

Антисыворотки к белкам получали по длительной схеме иммунизации кроликов: 100 мг белка в 1 мл полного адьюванта Фрейнда (1 объем ланолина, 2 объема вазелинового масла, 2,5 мг ВС, 100000 ед. пенициллина, 100000 ед. стрептомицина) вводили в мышцы задних конечностей кролика. После 10-дневного перерыва кроликам вводили внутривенно по 5 мг белка, в последующие 6 инъекций с интервалом 3 суток. На 9-й, 10-й дни после последней инъекции кроликов обескровливали, сыворотку отделяли от сгустка и использовали в серологических реакциях. Перед иммунизацией кроликов белками, им вводили по 1 мл витамин В12 (7 инъекций с интервалом 1 сутки). На 12 день после последней инъекции витаминов, кроликов иммунизировали белками березы. Для выявления специфичных белков у отдельных деревьев при установлении их генетических различий и сходства применяли истощенные антисыворотки, получаемые добавлением истощающего раствора белков лубяной ткани в раствор антисывороток. Смесь инкубировали 2 часа при +5, +7 °С, затем центрифугировали 20 мин. При 16000 об/мин., надосадочную жидкость использовали в серологической реакции с гомологичными белками. Исследование индивидуальной изменчивости березы повислой с применением современных методов разделения и идентификации белковых молекул позволяет получить более достоверную генетическую информацию. Береза повислая в Центральной лесостепи занимает обширные ареалы, обладает большим полиморфизмом, является самой молодой с точки зрения продвинутой в эволюции из р. *Betula* и в ней интенсивно идет процесс формообразования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение березы повислой в селекционном отношении начато сравнительно недавно. На первом этапе в естественных насаждениях были описаны формы по типу трещиноватости коры (Ткаченко, 1943) и предпринята попытка связать их с деловыми качествами ствола. Полиморфизм природных популяций березы по типу коры изучали многие исследователи (Гроздова, 1961; Данченко, 1971, 1972,

1973, 1974, 1984, 1990, 1992; Козьмин, 1980; Махнев, 1965, 1969, 1971, 1982, 1987), но, в основном, селекционные мероприятия осуществлялись на уровне массового отбора. Отбор плюсовых деревьев по целевым селективируемым признакам или косвенный отбор по морфологическим признакам без генетической оценки отобранного материала. Более полноценным и эффективным является сочетание массового и индивидуального отбора, т.е. отбора по фенотипу плюсовых деревьев с последующей их оценкой по генотипу. Исследование полиморфизма березы повислой представляет огромный интерес для лесокультурного производства, т.к. используя семена с учетом их генетического происхождения можно значительно повысить устойчивость и продуктивность насаждений.

Результаты проведенных исследований показали, что все анализируемые формы *Betula pendula* по трещиноватости коры характеризуются определенным спектром пероксидазы, что указывает на их генетическую обособленность. Генетическая система, контролирующая пероксидазу лубяной ткани полусибирского потомства первого поколения представлена в табл. 1.

Как видно из таблицы все формы по типу трещиноватости коры характеризуются различным спектром пероксидазы. Генетическая система, контролирующая пероксидазу лубяной ткани ромбовидтрещиноватой формы представлена 19 аллелями, из них 8 (2а, 3а, 4а, 5а, 8а, 9а, 10а, 12а) в катодной части и 11 (1А, 3А, 5А, 7А, 8А, 9А, 10А, 11А, 12А, 14А, 16А) в анодной. Ромбовиднокорая форма имеет 21 фракцию, из них 14 — в анодной и 7 — в катодной. Наличие катодных фракций (7а, 8а, 9а, 10а, 12а) только у ромбовиднокорых форм указывает на их генетическую обособленность от других форм, а высокая полиморфность их белка дает возможность предположить об их продвинутой в эволюции, очевидно, ромбовиднокорая и мелкоромбовиднокорая формы являются самыми молодыми с точки зрения эволюции.

Для всех форм по трещиноватости коры у березы повислой выявлены общие аллели в анодной 2А, 3А, в катодной 2А, что видимо отражает видовую специфику *Betula pendula* Roth. По количественной и качественной характеристике аллелей исследованные формы березы по типу коры можно разделить на три группы – первая группа, состоящая из ромбовиднокорой и мелкоромбовиднокорой форм, вторая группа гладкокорых берез, включающих в себя гладкокорую и бумажнокорую, третья группа представлена слоистокорой, шероховатокорой

Схема электрофоретического разделения пероксидазы березы повислой в пределах форм трещиноватости коры

Формы по типу трещиноватости коры	Число фракций	Условное обозначение фракций	
		Анодные фракции	Катодные фракции
Мелкоромбовиднокорая	19	1А, 3А, 5А, 8А, 9А, 10А, 11А, 14А, 15А, 17А, 19А	2а, 3а, 4а, 5а, 8а, 9а, 10а, 12а
Ромбовиднокорая	21	2А, 3А, 5А, 6А, 9А, 10А, 11А, 12А, 13А, 15А, 16А, 17А, 18А, 20А	2а, 3а, 4а, 5а, 7а, 8а, 9а
Мелкотрещиноватокорая	8	3А, 5А, 12А, 14А, 17А	2а, 4а, 5а
Шероховатокорая	15	3А, 5А, 10А, 11А, 12А, 14А, 15А, 17А, 19А	2а, 3а, 4а, 5а
Гладkokорая	9	3А, 5А, 10А, 11А	2а, 3а, 4а, 5а
Бумажнокорая	11	3А, 5А, 10А, 11А, 12А	2а, 3а, 4а, 5а
Слоистокорая	13	1А, 3А, 5А, 11А, 12А, 13А	1а, 2а, 3а, 4а, 5а

рой, мелкотрещиноватой. У первой группы ромбовиднотрещиноватых берез наблюдается тенденция к наиболее высокому белковому полиморфизму – выявлено до 21 аллели, вторая группа гладkokорых берез характеризуется более низкой белковой гетерогенностью – отмечено до 11 аллелей, третья группа трещиноватых берез по полиморфным белкам занимает промежуточное положение ближе к гладkokорым.

Генетическая изменчивость березы повислой по семьям и по отдельным деревьям показана в таблице 2. Изменчивость изозимов пероксидазы наблюдается как по семьям в пределах форм, так и по биотипам. Наибольший полиморфизм в пределах ромбовиднотрещиноватой формы, выявлен у семьи № 9, а наименьший у семьи №26. Невысокий уровень полиморфизма изоформ прослеживается у семей гладkokорой и бумажнокорой форм. В пределах семей так можно выделить деревья с разным уровнем полиморфности.

Данные изопероксидазного анализа показывают, что формы по типу трещиноватости коры можно считать генетическими маркерами.

Иммунохимическое исследование водорастворимых белков лубяной ткани березы повислой позволили установить определенную зависимость качественного состава белков лубяной ткани березы повислой от формовой принадлежности биотипа и филогенетического взаимоотношения между

формами. При этом выявлены четкие различия по числу полос преципитации, их расположению на иммуноэлектрофореграмме, наличию специфических белков в серологических реакциях с использованием истощенных антисывороток.

Белки ромбовиднокорой формы четырех деревьев семьи № 2 образовали с гомологичными антисыворотками от 5 до 6 полос преципитации: белки дерева № 1 с гомологичной антисывороткой формировали до 7 полос преципитации, дерева № 2 – также до 7 полос преципитации. Следует отметить, что при проявлении белков дерева №1 истощенной антисывороткой белками дерева № 2 в гомологичной реакции образование специфических белков для дерева № 1 не наблюдалось, что указывает на генетическую идентичность этих деревьев. Белки дерева № 3 формировали с гомологичной антисывороткой до 8 полос преципитации; выявлены белки дерева № 4. Они были проявлены только серологичной антисывороткой - сыворотка приготовлена, против белков дерева №3, в результате чего выявлено до 5 полос преципитации.

Ромбовиднокорая форма семьи № 9, которая характеризуется 7 и 6 полосами преципитации в гомологичных реакциях в иммунохимическом исследовании представлена деревьями №1 и №2.

Груботрещиноватая форма березы, представленная в серологическом исследовании двумя деревьями, которые по антигенным спектрам белков

близки к деревьям семьи №2 и семьи №9 ромбовиднотрещиноватой формы. Белки деревьев груботрещиноватой формы проявлены антисывороткой, приготовленной против белков деревьев ромбовиднокорой формы. Они формировали от 4 до 6 полос преципитации, что доказывает их близкое генетическое родство.

Гладкокорая форма березы повислой характеризуется низким уровнем белкового полиморфизма в отличие от ромбовиднотрещиноватой и груботрещиноватой форм. По антигенным спектрам выявлено до 2 полос преципитации с гомологичной антисывороткой. В серологической реакции с истощенной антисывороткой образована одна полоса преципитации, представляющая специфичные белки для гладкокорой формы. Это является дополнительным подтверждением генетического различия между гладкокорыми и ромбовиднотрещиноватыми формами березы повислой, выявленного и по данным изопероксидазного спектра.

Полусибсовое потомство второго поколения ромбовиднотрещиноватой формы проявлено антисывороткой, приготовленной против белков материнского дерева и дерева гладкокорой формы. В первом случае выявлено до 5 полос преципитации, во втором – 1 полоса, что подтверждает их генетическое родство в пределах форм и с материнским деревом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разнообразие типов спектра у полиморфных белков березы повислой отражает высокую степень генетической изменчивости вида.

2. Формы березы повислой по трещиноватости коры можно считать генетическими маркерами-фенами.

3. Высокая полиморфность пероксидазы ромбовиднотрещиноватой формы указывает на ее продвинутость в эволюции.

4. Белковые маркеры позволяют достаточно точно на ранней стадии диагностики проверить

генотип плюсового дерева и определить его гетерозиготность.

5. Данные изопероксидазного и иммунохимических исследований, белков лубяной ткани различных форм трещиноватости коры первого и второго поколений показывают, что наблюдается тенденция повышения гетерогенности, как пероксидазы, так и антигенных спектров белков у быстрорастущих форм ромбовиднотрещиноватой, слоистотрещиноватой. Это указывает на их гетерозиготность и объясняет стабильность прироста в онтогенезе, устойчивость к неблагоприятным факторам среды, высокую приживаемость и сохранность, устойчивость к болезням и вредителям, повышенную продуктивность.

6. Наиболее перспективной формой для получения экологически устойчивого гетерозисного потомства, является ромбовиднокорая форма.

7. Уровень гетерогенности пероксидазы можно использовать как маркер для отбора семей березы повислой с дальнейшим их использованием в селекции при скрещивании для получения гетерозисного эффекта, а также при создании клоновых плантаций.

8. Проведенные иммунохимические исследования подтвердили различие форм по типу трещиноватости на генетическом уровне. Наиболее низким уровнем характеризуется гладкокорая форма.

9. Высокая совместимость материнского растения полусибсового потомства первого поколения и его семенного потомства второго поколения по антигенным спектрам белков подтверждает на генетическом уровне наследуемость признака трещиноватости коры по материнской линии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Г. Конарев. Белки растений как генетические маркеры. — М.: Колос, 1983. — С. 22—25.

2. Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов, В. В. Потенко. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. — Гомель, 1989. — С. 12.