

Транспирация горных буковых лесов Восточной Грузии в зависимости от возраста

Л. Т. Долидзе, З. К. Манвелидзе, Н. И. Варшанидзе

Исследования проводили в Восточной Грузии (Кахетии). Объекты работ:

1) одновозрастный молодой 25-летний буковый древостой;

2) одновозрастный приспевающий 100-летний буковый древостой;

3) разновозрастный буковый древостой с преобладанием спелого поколения без подлеска 130 (70–170) лет;

4) разновозрастный буковый древостой с преобладанием спелого поколения с примесью перестойного 160 (90–250) лет.

Горные буковые леса (*Fagus orientalis* L.) расположены в Ахметском лесхозе, лесничество Илто, урочище Джабури, высота 1300–1350 м над ур. моря, на склонах северной, северо-восточной экспозиций крутизной 20–25°. В буковых древостоях в качестве примеси произрастают граб, ильм, осина. Под этими древостоями в основном формируются бурые лесные почвы с ясным иллювиальным горизонтом (рыжевато-бурого цвета, очень вязкий) и осветленной верхней частью. Эта почва относится к бурым лесным псевдоподзоленным. В ней почти не выражен гумусовый горизонт, а лессированный (осветлённый) начинается сразу под подстилкой, мощность которой достигает 4–6 см.

Количество воды на транспирацию древостоев бука восточного определялось нами методом по количеству сухого вещества листьев, оп-

ределенному на срубленных модельных деревьях, и количеству испаряемой воды для образования сухого вещества листьев [1, 2]. Расчет массы листьев проводили по среднему дереву диаметром более 12 см; определяли массу сухих листьев срубленного дерева; испарение на 100 г сухого вещества листьев за вегетационный период; количество испарившейся воды в среднем на дерево за вегетационный период и количество испарившейся воды всеми деревьями на 1 га за вегетационный период. К полученному количеству приплюсовывали 10–15% с учетом испарения молодняком и количество расхода воды на транспирацию в зимнее время (0,4–4%) [2]. Взвешивание проводилось сразу после срезания (за 0,5 мин). Срезали здоровые, нормально развитые побеги на половине высоты ствола модельных деревьев: в молодняке – на высоте 4 м, в приспевающем древостое – на 13 м, в спелых древостоях – на высоте 15–16 м. Наблюдения проводились в 2000–2003 гг. в вегетационный период по несколько дней в 8 ч утра, 13 ч и 18 ч.

При исчислении количества испарения, по нашим данным, 100 г сырых буковых листьев, высушенных при 105 °С до постоянной массы, в среднем равняется 34,0 г. Вегетационный период в Илтоевском лесничестве Ахметского лесхоза длится с 15 мая по 15 октября, т.е. 150 сут. Отсюда, 68 сут. по 20-летним наблюдениям Ахметского метеорологического пункта – дождливые и па-

смурные дни. Средний показатель часов за вегетационный период равен 656 ч. Исследованиями установлено следующее:

1. В молодом буковом 25-летнем древостое количество стволов на 1 га составляет 2588 экземпляров. Средний диаметр срубленного модельного дерева равен 8,0 см, средняя высота – 8,4 м. Масса сырых листьев модельного дерева составляет 2,0 кг; масса сухого вещества листьев модельного дерева – 752 г. Испарение на 100 г листьев с веточками – 66 г, листьев без веточек за 5–7 мин в среднем – 2,5 г. Испарение на 100 гр. сухого вещества за вегетационный период составляет 70286 г, количество испарившейся воды со среднего модельного дерева – 528,5 кг, а со всех деревьев на 1 га - 1367,8 т.

2. В буковом припевающем 100-летнем древостое количество стволов диаметром более 12 см на 1 га составляло 406, средний диаметр срубленного модельного дерева – 27 см, средняя высота – 25 м, возраст – 99 лет. Масса сырых листьев модельного дерева равна 13,2, масса сухого вещества листьев модельного дерева – 4963 г. Испарение на 100 г листьев с веточками составляет 63 г, листьев без веточек за 5 мин в среднем – 2,2 г. Испарение на 100 г сухого вещества листьев за вегетационный период – 61851 г. Количество испарившейся воды со среднего модельного дерева равно 3070 кг, а со всех деревьев диаметром выше 12 см на 1 га – 1246,4 т. Приплюсовав к этому количеству 15% в счет испарения молодняком и 2,2% на испарение в зимнее время, транспирация на 1 га древостоя составит 1464,9 т воды.

3. В разновозрастном буковом древостое с господством спелого поколения 130 (70–170) лет, количество стволов диаметром более 12 см на 1 га – 233. Средний диаметр срубленного модельного дерева составляет 38 см, высота – 29 м, возраст – 123 лет. Масса сырых листьев модельного дерева составляет 14,514 г. Испарение на 100 г листьев с веточками равняется 66 г, без веточек за 5 мин. в среднем – 1,9 г воды. Испарение на 100 г сухого вещества листьев за вегетационный период равно 53417 г, количество испарения со среднего модельного дерева – 7745 кг; количество испарившейся воды со всех деревьев на 1 га – 1804,6 т.

4. В разновозрастном буковом древостое с господством спелого с примесью перестойного поколения 160 (90 – 250) лет количество стволов диаметром более 12 см на 1 га – 211; средний диаметр срубленного модельного дерева составляет 48 см, высота – 32 м; возраст – 169 лет. Масса сырых листьев модельного дерева вместе с веточками составляет 99,6 кг, без веточек – 49,2 кг. Масса сырых листьев модельного дерева даёт 18499 г сухого вещества. Испарение на 100 г листьев с веточками – 66 г, без веточек за 5 мин., в среднем, равняется 1,6 г воды. Испарение на 100 г сухого вещества листьев за вегетационный период равно 44870 г. Количество испарившейся воды со среднего модельного дерева равно 8300 кг; со всех деревьев на 1 га древостоя – 2052,5 т.

Таким образом, расход воды на транспирацию больше в разновозрастном древостое, чем в одновозрастном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Китредж, Дж. Влияние леса на климат, почвы и водный режим // Пер. с англ. Е. Н. Аксеновой, под ред. С. И. Зонна, изд. «Иностранная литература». – М., 1951. – 456 с.
2. Engler, A. Untersuchungen über den Einfluss des Waldes auf den Stand der Gewässer. Mitteilungen der Schweiz / Engler, A. // Zentralanst. f. d. forstl. Versuchswesen, B.d. 12, 1919.

Изучение генофонда сирени в ЦБС НАН Беларуси

*В. Н. Решетников, Е. В. Спиридович, Н. В. Македонская, О. В. Чижик, Т. В. Антипова, Н. Г. Брель Н. Г., Центральный Ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси*

Коллекция сирени ЦБС НАН Беларуси, созданная методом прививки в 1954–1964 гг., состоит из более 200 таксонов. Она достаточно обширна по видовому, сортовому и гибриднему разнообразию и постоянно пополняется новыми сортами. Коллекция также служит источником для селекционной работы и размножения перспективных и редких сортов.

В коллекции представлены 23 вида и 200 сортов разного срока цветения с простыми (60%) и махровыми (40%) цветками с широкой цветовой гаммой: белой (18%), лиловой (48%), розовой (14%), пурпурной и фиолетовой (20%). Коллекция пополняется новыми сортами корнесобственного происхождения, что позволяет ее омолодить. Еще одно направление работы с коллекцией сирени в ЦБС – сохранение генетического биоразнообразия в культуре *in vitro*. В настоящее время в коллекции *in vitro* сохраняется 30 сортов сирени. Оптимизируются биотехнологические приемы их эффективного микроклонирования. Ведется поиск лучших агротехнических приемов и методов адаптации клонированного растительного материала. Создаются маточные плантации оздоровленного сортового материала. Параллельно проводится молекулярно-генетическое маркирование клонов сирени, полученных в культуре *in vitro*.

Данные, полученные на основе многолетних фенологических наблюдений, изучения особенностей роста и цветения, нуждаются в систематизации и дополнении биохимическими характеристиками. Сложность генетической интерпретации морфологических признаков, связанная с полигенным наследованием и, как правило, сильным влиянием среды на фенотипи-

ческое проявление признака, зачастую ограничивает использование методов традиционного описания морфологических и цитологических характеристик растений.

С 2004 г. в ЦБС НАН Беларуси начаты работы по изучению генома сирени помощью RAPD-метода, позволяющего идентифицировать имеющиеся в коллекции дикорастущие виды и культурные сорта.

Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используются в настоящее время для изучения многих видов организмов. Они отличаются высокой эффективностью, производительностью, хорошей воспроизводимостью и относительной экономичностью. Все вышеперечисленные достоинства в полной мере относятся к RAPD-методу, основанному на изучении произвольно-амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) [1]. Простота этого метода обеспечивается тем, что он не требует предварительного знания специфической последовательности амплифицируемой ДНК, поэтому для его проведения используются праймеры, отобранные произвольным образом.

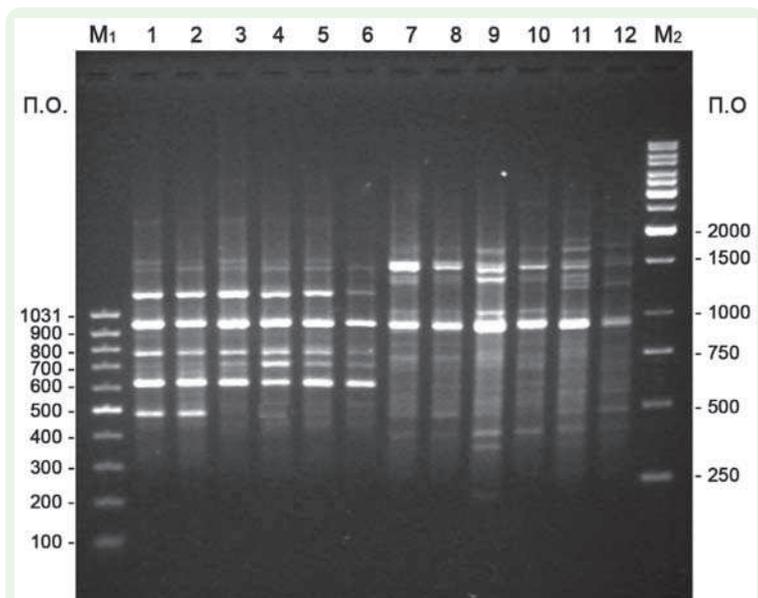
Для RAPD-анализа генома сирени из коллекции ЦБС НАН Беларуси были отобраны следующие представители: 4 вида *Syringa amurensis*, *S. pekinensis*, *S. chinensis*, *S. vulgaris* и следующие сорта сирени обыкновенной: Хорошее настроение, Павлинка, Лунный свет, Вера Хоружая, Президент Греви, Лебедушка, Минчанка, Красавица Москвы, Радж Капур, Реомюр, Эстер Стейли, Нестерка, Президент Пуанкаре и сирень группы Престопа-Роялти. Препараты суммарной ДНК

получали по методике [2] из листьев растений. В работе использовали 10 олигонуклеотидных 10-членных праймеров. Продукты ПЦР разделяли и визуализировали по стандартным методикам [3].

Первый этап работы при использовании молекулярных методов исследования ДНК растений – получение высокоочищенной геномной ДНК из различных растительных тканей. Несмотря на существование ряда опубликованных протоколов по выделению тотальной ДНК растений, при работе со сложными для исследования древесными культурами, к которым относится и сирень, необходима модификация этих методик. Это связано с наличием в клетках этих растений большого количества вторичных метаболитов, в том числе эндогенных полисахаридов и фенольных соединений, которые трудно отделить от ДНК. Образцы ДНК, полученные нами по нескольким стандартным методикам [4, 5], содержали большое количество примесей и не могли быть использованы для дальнейшего RAPD-анализа. Модификация протокола выделения тотальной растительной ДНК с помощью СТАВ-буфера позволила получить высококачественную тотальную ДНК сирени. В результате данного этапа работы также установлено, что наиболее подходящим растительным материалом являются молодые, активно растущие побеги и листья.

Следующий этап работы состоял в оптимизации RAPD-метода и идентификации праймеров, которые обнаруживают полиморфизм применительно к отобранным видам и сортам коллекции сирени. Испытано 10 произвольных десятичленных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и проценту G-C пар нуклеотидов. Электрофоретическое фракционирование продуктов полимеразной цепной реакции препаратов ДНК с этими произвольными десятичленными праймерами (RAPD) позволило выявить широкий спектр амплимерных зон. Следует отметить, что из 10 использованных праймеров, полиморфные спектры были получены по 6 из них для изучаемых образцов ДНК сирени. Анализ по данным праймерам у исследованных образцов обнаружил амплимерные зоны, 29 из которых были полиморфны. На основании полученных RAPD-спектров для всех исследованных сортов сирени были составлены многолокусные RAPD-паспорта. Следует отметить, что использовали амплимерные зоны, электрофоретическая идентификация которых была наглядна и легка, а генетическая детерминация не вызывала никаких сомнений. Для количественной оценки полиморфизма и определения уровня дивергенции между исследуемыми сортами сирени результаты RAPD-анализа были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, где присутствие фрагмента принималось за 1, отсутствие – за 0 (рис.). Размер каждой амплифицированной зоны вычислялся относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной молекулярной массой. Обозначение зон производилось по названию праймера, использованного для полимеразной цепной реакции, и размера зоны (в парах нуклеотидов) в надстрочнике.

Oligo18: 1 – сорт М.Шолохов; 2 – микроклон М.Шолохов; 3 – сорт Флора; 4 – мимикроклон Флора; 5 – сорт Жемчужина; 6 – микроклон Жемчужина; Oligo19: 7 – сорт М.Шолохов; 8 – микроклон М.Шолохов; 9 – сорт Флора; 10 – микроклон Флора; 11 – сорт Жемчужина; 12 – микроклон Жемчужина; M₁ – маркеры размеров ДНК (100bp DNA Ladder, Fermentas); M₂ – маркеры размеров ДНК (1kb DNA Ladder, Fermentas).



RAPD-анализ ДНК исходных сортов и микроклонов сирени

Показано, что популяции различаются по генетической вариабельности их представителей, которая выражалась не только в наличии полиморфных локусов в ДНК некоторых растений, но и в варьировании интенсивности гомологичных фрагментов в профилях амплификации ДНК у разных растений.

Для стабильного поддержания коллекции *in vitro* наряду с подбором оптимального состава питательных сред, используемого гормонального баланса немаловажным условием является сохранение целостности генотипа полученных микропобегов. Изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой. Наиболее вероятными источниками генетической вариабельности могут быть мутации, хромосомные нарушения, а также возникновение полиплоидных клеток. Эти нарушения накапливаются главным образом при культивировании каллусных тканей. Следует отметить, что в нашем случае микропобеги сирени получали прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек, без образования каллуса. Таким образом, этап, при котором наблюдается накопление генетических отклонений, а именно культивирование каллуса, в разработанной нами технологии отсутствует. Для подтверждения генетической идентичности полученных клонов с исходными генотипами проведено сравнение продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами

RAPD-PCR исходных генотипов. Для анализа использовали праймеры, показавшие наибольший полиморфизм на различных генотипах сирени.

При сравнении продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных сортов различий не обнаружено, что может служить доказательством генетической идентичности полученных клонов и материнских сортов. Таким образом, разработанная система микроклонального размножения сирени может использоваться для получения генетически однородных побегов широкого спектра генотипов сирени.

Проведенная работа позволила перевести исследования растений сирени на качественно новый уровень, систематизировать по ряду биохимических показателей. В результате исследований отработан метод выделения высокоочищенной геномной ДНК из листьев сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР, адаптирован метод RAPD-анализа для паспортизации сирени.

Изучение коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси в рамках выполненных проектов позволила создать компьютерную базу данных, которая объединяет сведения по систематике, фенотипические признаки, геоботанические показатели, условия культивирования, биохимические характеристики, а также рекомендации по их использованию в различных отраслях народного хозяйства республики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сиволап, Ю. М. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами в : Цитология и генетика / Ю. М. Сиволап, М. Н. Календарь, С. В. Чеботарь. – 1994, 28. – С. 54–61.
2. Doyle, J. J. Isolation of plant DNA from plant tissue / Doyle J. J., Doyle J.L. // Focus. – V. 12. – 1990. – P. 13–15.
3. Westermeier, R. Electrophoresis in practice (Third Edition) / Westermeier R. – WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001. – 349 p.
4. Kim, K. J. A chloroplast DNA phylogeny of lilacs (*Syringa*, Oleaceae): plastom groups show a strong correlation with crossing groups / Kim K. J., Jansen R. K. // Am. Bot. – 1998. – V. 85. – № 9. – P. 1338–1351.
5. Li, J. Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ITS regions / Li J., Alexander J., Zhang D. // System. Botany J. 2002. – V. 27. – № 33. – P. 592–597.