

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДЕРЕВЬЕВ НА КЛОНОВЫХ ПЛАНТАЦИЯХ ХВОЙНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ВИДОВ В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

К.Г. Зацепина¹, А.К. Экарт², В.В. Тараканов¹

¹ Западно-Сибирский филиал Института леса СО РАН
630082 Новосибирск, ул. Жуковского 100/1; e-mail: vytarh@yandex.ru

² Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок 50; ekart@pochta.ru

В статье описывается второй (генетический) этап паспортизации клоновой плантации сосны обыкновенной, осуществленный методом аллозимного анализа с учетом результатов первого (фенетического) этапа паспортизации. Для генетической паспортизации фенетически идентичных привитых деревьев предложен метод сопоставления "чистых" (однораметных) и "смешанных" (многораметных) образцов, существенно сокращающий затраты на его проведение. Оценена эффективность паспортизации семеносящих деревьев по фенам генеративных органов. Составлены генетические (аллозимные) паспорта всех клонов, и уточнена схема их размещения на исследуемой плантации.

Ключевые слова: генетическая паспортизация, сосна обыкновенная, клон, фермент, электрофорез

The second (genetic) stage of certification of a *Pinus sylvestris* clonal plantation, carried out by a method allozyme analysis taking into account results of the first (phenetic) stage of certification, is described. For genetic certification of phenetically identical graftings the method of comparison of "pure" and "mixed" samples, which essentially reduces expenses for its carrying out, is offered. Efficiency of seed trees certification on reproductive structures's phenes is estimated. The genetic (allozyme) passports of all clones and the corrected scheme of their placing in investigated seed orchard are made.

Key words: genetic certification, *Pinus sylvestris*, clone, enzyme, electrophoresis

ВВЕДЕНИЕ

В связи с необходимостью исключения ошибок в маркировке родословных деревьев на клоновых лесосеменных плантациях (ЛСП) лесобразующих видов для продолжения селекционного процесса необходимо осуществить индивидуальное генотипирование. По данным "Рослесозащиты", на 2008 г. в России было отобрано около 37 тыс. плюсовых деревьев различных лесобразующих пород, потомствами которых создано 3,7 тыс. га ЛСП (Кобельков, 2008). При густоте около 200 шт./га на такой площади произрастает примерно 740 тыс. потомков плюс-деревьев, преимущественно вегетативного происхождения. При стоимости 1 образца (дерева) 0,5-1,5\$ на их генетическую паспортизацию потребуется 370000-1100000\$, или, с учетом необходимости паспортизации самих плюс-деревьев - около 12-35 млн.руб. Для сокращения затрат на проведение этой дорогостоящей операции разработан метод последовательной паспортизации, включающий фенетический и генетический этапы, и на одной из плантаций сосны в Алтайском крае осуществлен её первый этап (Кальченко, Тараканов, 2010).

Цель настоящего исследования – осуществить аллозимное генотипирование всех привитых деревьев на предварительно изученной по фенам ЛСП

сосны и на этой основе оценить эффективность фенетического этапа паспортизации. При этом были поставлены задачи: 1) оценить эффективность способа сопоставления "чистых" (однораметных) и "смешанных" (многораметных) образцов одноименных клонов для быстрого выявления случаев ошибочной маркировки рамет; 2) на исследуемой клоновой плантации выделить правильно и ошибочно маркированные деревья; 3) определить к какому клону относятся привитые деревья с утерянной маркировкой и деревья, по различным причинам не идентифицированные по фенам; 4) составить аллозимные паспорта всех изученных клонов и уточнить схему их размещения на исследуемой ЛСП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования является клоновая плантация сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L., созданная привитыми саженцами сосны по стандартной технологии в 1988 году в Озерском лесничестве Алтайского края (ЛСП - 88) (табл. 1).

Результатом фенетического этапа паспортизации этой плантации стало разделение всех привитых деревьев на несколько категорий (Кальченко, Тараканов, 2010): 1) "Типичные" – одноименно маркированные привитые деревья, идентичные по признакам-фенам и составляющие подавляющее большинство рамет внутри соответствующих клонов; 2) "Нетипичные" – ошибочно маркированные

Работа выполнена при финансовой поддержке ИП СО РАН № 53, РФФИ 11-04-92226-Монг_а и РФФИ 11-04-00033-а

Таблица 1 - Общая характеристика клоновой плантации сосны обыкновенной ЛСП-88 (Кальченко, Тараканов, 2010)

| Площадь, га | Число клонов, шт. | Число деревьев | | |
|-------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------|
| | | Не привитых, шт. (%) | Привитых, шт. (%) | Итого, шт. (%) |
| 3,0 | 47 | 59 (10,5) | 501 (89,5) | 560 (100) |

привитые деревья, явно отличающиеся от типичных рамет соответствующих клонов по анализируемым фенам; 3) "Приблизительно похожие на типичные" – не уверенно идентифицируемые методами фенетики привитые деревья; 4) "Привитые деревья неизвестного происхождения" – деревья, для которых на схемах не указана их клоновая принадлежность; 5) «Не изученные методами фенетики» - преимущественно низкоурожайные

деревья, у которых отсутствовали генеративные органы. Все непривитые и большинство ошибочно маркированных деревьев были удалены при изреживании. После изреживаний схема плантации с учетом сходства по фенам приняла вид, отраженный на табл. 2. Для генетической паспортизации привитых деревьев, отнесенных к различным категориям (см. табл. 2), использовали метод аллозимного анализа.

Таблица 2 - Часть рабочей схемы ЛСП-88, на которой отражены результаты паспортизации деревьев методами фенетики

| Номер ряда | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------|------|-------|------|-----|------|------|-------|------|------|------|-------|
| 1 | | 69 | 103 | | 357 | | 356нт | | 357~ | | 356нт |
| 2 | 17= | | | 320 | | 505= | | 506= | | 505= | |
| 3 | 19= | | 45 | | 501= | | 504= | | | 507= | 22 |
| 4 | | 13 | | 328 | | 510= | | 283= | | | |
| 5 | 357= | | 223 | | 357= | | | 282= | | Пр | |
| 6 | | 356нт | | | | 505= | | 506= | | 505= | 332= |
| 7 | 22 | | 325= | | Пр | | 22 | | 501= | | |
| 8 | | 13 | | 328 | | 16/3 | | 283= | | 510= | 48 |
| 9 | 375= | | 73 | | 48 | | | | 223 | | |
| 10 | | 356нт | | | | 505= | | 506= | | 505- | 514= |

Примечания: 1) цифры в клетках таблицы – номера клонов; 2) различными индексами обозначены категории рамет, установленные по результатам фенетической паспортизации: «=» - «типичные»; «нт» - «нетипичные»; «~» - «приблизительно похожие на типичные»; «Пр» - «привитые деревья неизвестного происхождения»; отсутствие индекса при номере клона - «не изученные методами фенетики» деревья. Объяснения в тексте.

Материалом для исследования послужили вегетативные почки, собранные с отдельных деревьев. Гомогенизацию почек осуществляли в 1-2-х каплях экстрагирующего буфера 0,05 М Трис-НСl pH 7,7, содержащего поливинилпирролидон (3%), дитиотрейтол (0,06 %), трилон Б (0,02%) и β-меркаптоэтанол (0,05 %). Разделение экстрактов проводили методом горизонтального электрофореза в 13 %-ном крахмальном геле в трех буферных сис-

темах: I – морфолин-цитратной, pH 7,0 (Clayton, Tretiak, 1972), II – трис-цитратной, pH 8,5 / гидроксид лития-боратной, pH 8,1 (Ridgway, et al., 1970), III – трис- ЭДТА- боратной, pH 8,6 (Markert, Faulhaber, 1965). Составы гелевых и электродных буферов не отличались от рекомендуемых. Условия разделения экстрактов во всех буферных системах были одинаковыми: 6 часов при силе тока 40 mA и напряжении 170 V.

Таблица 3 - Ферментные системы, использованные для их электрофоретического разделения, буферные системы и используемые локусы

| Фермент | Номер по К.Ф. | Буферная система | Локусы и число выявленных аллелей |
|--|---------------|------------------|--|
| Малатдегидрогеназа (MDH) | 1.1.1.37. | I | <i>Mdh-2</i> (2) <i>Mdh-3</i> (2) <i>Mdh-4</i> (2) |
| Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT) | 2.6.1.1. | II | <i>Got-2</i> (5) <i>Got-3</i> (3) |
| Шикиматдегидрогеназа (SKDH) | 1.1.1.25. | I | <i>Skdh-1</i> (5) <i>Skdh-2</i> (2) |
| Диафараза (DIA) | 1.6.4.3. | III | <i>Dia-2</i> (2) |
| 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD) | 1.1.1.44. | I | <i>6-Pgd-2</i> (2) |
| Формиатдегидрогеназа (FDH) | 1.2.1.2. | II | <i>Fdh</i> (4) |
| Фосфоглюкомутаза (PGM) | 2.7.5.1. | III | <i>Pgm-1</i> (2) |
| Глутаматдегидрогеназа (GDH) | 1.4.2.3. | III | <i>Gdh</i> (2) |
| Флюоресцентная эстераза (FL-EST) | 3.1.1.2. | II | <i>Fe-2</i> (5) |
| Алкогольдегидрогеназа (ADH) | 1.1.1.1. | III | <i>Adh-1</i> (2) <i>Adh-2</i> (4) |

Гистохимическое окрашивание ферментов после электрофореза осуществляли по стандартным прописям (Brewer, 1970; Vallejos, 1983; Гончаренко, Падутов, 1988; Manchenko, 1994 и др.) с некоторыми модификациями.

Для идентификации клонов было использовано 15 полиморфных локусов (табл. 3), аллозимные варианты которых хорошо разделяются в указанных выше буферных системах. Обозначение ферментов, локусов и аллелей производили по Ф. Айала (1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде, чем изложить результаты исследований, отметим, что 2-х этапная паспортизация деревьев на клоновых плантациях осуществлена впервые. При этом в ходе генетической паспортизации «типичных» рамет, идентичных по фенетическим характеристикам, нами был использован способ сопоставления «чистых» (однораментных) и «смешанных» (многораментных) образцов. В таком случае *a priori* у каждого из клонов общее число образцов для аллозимного анализа можно сократить всего до двух: «контрольного» (из одной раметы) и «смешанного» (из всех остальных фенетически идентичных рамет). Если все раметы имеют

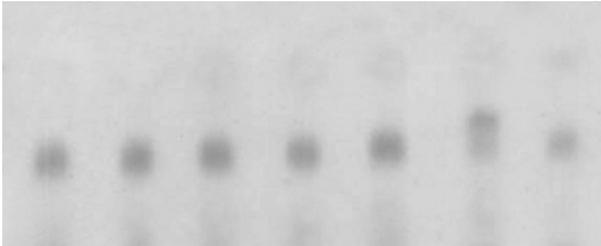


Рисунок 1 - Фореграмма глутаматдегидрогеназы шести «смешанных (многораментных)» и одного «контрольного» (последняя «дорожка») образцов почек от «типичных» рамет клона № 357 ($Gdh^{121/100}$). Выделяется предпоследний образец, «загрязненный» примесью чужеродного генотипа ($Gdh^{100/100}$), который при фенетическом анализе был ошибочно отнесен к «типичной» рамете клона № 357

одинаковый генотип, то «смешанный» образец должен быть идентичен «контрольному» образцу от единственной раметы этого же клона («контрольная» рамета по очевидным причинам не должна

включаться в «смешанный» образец). Теоретически сокращение затрат на генотипирование деревьев при таком подходе прямо пропорционально числу рамет в «смешанных» образцах, но оно лимитируется эффектом «разбавления» аллозимов от отдельных деревьев. Поэтому вначале был проведен специальный эксперимент, в ходе которого в смешанные образцы помещались почки от 2-х различных генотипов в соотношении от 1:1 до 10:1.

Оказалось, что эффективность выявления «чужеродного» генотипа достаточно высока при числе смешиваемых рамет до 4 штук на образец. При большем количестве рамет в образце по некоторым из локусов гомозиготы с примесью постороннего генотипа нечетко отличаются от гетерозигот, что может приводить к ошибкам в идентификации.

Таким образом, выборка из 138 «типичных» рамет 46 клонов была разбита на 29 «контрольных» и 58 «смешанных» образцов из 2-4 рамет. Из 58 шт. смешанных образцов было выявлено 4 «загрязненных» (рис. 1).

Для того чтобы ответить на вопрос, какие деревья обуславливают эффект «загрязнения», все раметы, входящие в «смешанный» образец, были проанализированы индивидуально. Это позволило выявить на схемах конкретные ошибочно маркированные деревья, которые не удалось правильно диагностировать на этапе фенетической паспортизации. Если принять данные аллозимной паспортизации за «идеальные» (в действительности идентификация клоновой принадлежности генетическими методами имеет вероятностную природу и зависит от числа исследуемых полиморфных локусов), то доля безошибочно идентифицированных по фенам привоев в выборке всех «типичных» рамет составляет: $136/138=97,1\%$ (табл. 4).

Привитые деревья всех остальных категорий были проанализированы индивидуально. В выборке «нетипичных» 2 дерева по их аллозимному генотипу оказались ошибочно отнесенными к этой категории (по составу аллозимов они идентичны «типичным» раметам соответствующих клонов). Это может быть вызвано существенными изменениями габитуса, который также принимался во внимание на этапе фенетической паспортизации, и генеративных структур вследствие повреждающего воздействия внешних условий (болезни, вредители, несовместимость привоя с подвоем и т.п.).

Таблица 4 - Итоги генетической паспортизации привитых деревьев на клоновой ЛСП-88

| Оцениваемый показатель | Шт. | % |
|---|---------|------|
| Доля привитых деревьев, генотипированных по аллозимным локусам | 255/255 | 100 |
| Доля деревьев, правильно отнесенных к «типичным» для соответствующих клонов на этапе фенетической паспортизации | 134/138 | 97,1 |
| Доля деревьев, правильно отнесенных к «нетипичным» для соответствующих клонов на этапе фенетической паспортизации | 5/7 | 71,4 |
| Доля деревьев с утраченной маркировкой, для которых восстановлена их вероятная клоновая принадлежность | 13/24 | 54,2 |
| Доля деревьев с утраченной маркировкой, которые относятся к неизвестным клонам | 11/24 | 45,8 |

В выборке 24-х привитых деревьев с утраченной маркировкой, у которых отсутствует номер клона на схеме размещения, для 13 деревьев установлена их вероятная принадлежность к клонам, представленным на исследуемой плантации. Для 11 деревьев клоновая принадлежность в настоящий момент не установлена. При этом они четко дифференцируются на 2 группы, но клонов с таким генотипом нет среди маркированных деревьев данной плантации. В качестве примера некоторые из этих результатов приведены в табл. 5. Очевидно, задача идентификации неизвестных клонов будет решена в ходе расширения работ по данному направлению, предполагающему генотипирование как самих плюсовых деревьев, так и их потомков, представленных на других плантациях изучаемого региона.

Таблица 5- Результаты аллозимной идентификации клоновой принадлежности привитых не маркированных деревьев на ЛСП-88

| Прививка с утраченной маркировкой (в скобках – номер строки и столбца на схеме размещения) | Предполагаемый № клона |
|--|------------------------|
| Пр (11-16) | 31 |
| Пр (8-44) | 31 |
| Пр (6-44) | 223 |
| Пр (1-25) | 223 |
| Пр (9-45) | 357 |
| Пр (10-26) | 507 |
| Пр (2-32) | 507 |
| Пр (10-25) | x1 |
| Пр (10-5) | x1 |
| Пр (2-38) | x1 |
| Пр (11-40) | x1 |
| Пр (5-17) | x2 |
| Пр (12-39) | x2 |
| Пр (5-7) | x2 |
| Пр (13-21) | x2 |

Примечание: «x1» и «x2» - клоны неизвестных плюс-деревьев.

Наиболее интересен вопрос об эффективности метода «смесей». В этой связи отметим, что сопоставление "чистых" и "смешанных" образцов может применяться при анализе как аллозимов, так и ДНК. Экономическую эффективность его применения (степень сокращения затрат на реактивы) можно оценить по отношению общего числа всех привитых деревьев на изучаемой плантации к числу проанализированных образцов.

В нашем случае это соответствует $255/149=1,71$. Очевидно, что чем точнее маркированы деревья на площади и чем больше число рамет в каждом клоне, тем выше будет показатель экономии средств при паспортизации. Например, при очень высоком качестве маркировки клонов, когда после этапа фенетической паспортизации все привитые деревья будут отнесены к категории "типичные", и хорошем представительстве клонов затраты на реактивы можно будет снизить практически в 3 раза. Возможно, что при осуществлении электрофореза ферментов в полиакриламидном геле, а также при анализе ДНК число рамет, смешиваемых в одном образце, можно будет

увеличить, что приведет к еще большей эффективности этого способа.

Основной практический итог проведенных исследований заключается в аллозимной паспортизации всех привитых деревьев и клонов, а также в корректировке схемы размещения клонов на исследуемой плантации. Полученные результаты подтверждают вывод о необходимости паспортизации всех деревьев на генетико-селекционных объектах, что необходимо для повышения эффективности селекционного процесса. В этой связи отметим, что доля неверно маркированных и не маркированных деревьев на исследуемой площади составила по нашим данным 11,0 %.

Данные, полученные в ходе фенетической и аллозимной паспортизации, будут использованы в дальнейшем для оценки уровня изменчивости клоновых плантаций, а также для изучения связей между генетически маркерными и количественными признаками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате генетической паспортизации клоновой плантации плюсовых деревьев сосны обыкновенной, осуществленной с помощью метода аллозимного анализа, генотипировано по 15 полиморфным локусам 255 привитых деревьев 46 клонов, и скорректирована схема их размещения на площади.

Сопоставление данных по фенетической паспортизации, осуществленной ранее, с данными настоящего этапа исследований позволило оценить эффективность паспортизации деревьев по фенам генеративных органов, которая составила около 97 %. Предварительная разбивка привитых деревьев на категории по данным фенетического анализа и использование способа сопоставления "чистых" (однораметных) и "смешанных" (многоаметных) образцов внутри фенетически однородных групп (клонов) позволяет сократить затраты на аллозимный анализ при использовании крахмального геля в 2-3 раза.

Уровень ошибок при маркировке клонов на исследуемой лесосеменной плантации составил 11 %. При этом выявлено 11 привитых деревьев 2-х неизвестных клонов. Это еще раз подтверждает вывод о генетической паспортизации, как обязательном элементе селекционного процесса.

Благодарности

Авторы выражают признательность А.Я. Ларионовой, А.Н. Кравченко и И.В. Тихоновой за ценные замечания и помощь в анализе результатов исследований, Л.И. Кальченко за сбор образцов.

БИБЛИГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Айала, Ф. Введение в молекулярную и эволюционную генетику / Ф. Айала; пер. с англ. А.Д. Базыкина. – М.: Мир, 1984. - 232 с.
Гончаренко, Г.Г. Руководство по исследованию древесных видов методом электрофоретического анализа изо-

- ферментов / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов - Гомель: БелНИИЛХ, 1988. - 66 с.
- Кальченко, Л.И. Поэтапная паспортизация деревьев на клоновых плантациях сосны обыкновенной: использование методов фенетики / Л.И. Кальченко, В.В. Тараканов // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – Т.27. - №1-2. – С. 87-90.
- Кобельков, М.Е. Лесное семеноводство на пороге перемен / М.Е. Кобельков // Лесная Россия. Лесное семеноводство. - 2008.- № 9. -С. 4-8.
- Brewer, G.J. Introduction to isozyme techniques / G.J. Brewer. - N.Y. - L.: Academ. press, 1970. - 186 pp.
- Clayton, J.W. Amino-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis / J. W. Clayton, D.N. Tretiak // J. Fisheries Research Board Canada.- 1972. – V. 29. – P. 1169-1172.
- Manchenko, G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels / G.P. Manchenko. - G.P CRC Press, Inc. - 1994. - 574 pp.
- Markert, C.L. Lactate dehydrogenase isozyme patterns in fish / C.L. Markert, I. Faulhaber // J. Exp. Zool. – 1965. - V. 159, N. 2. – P. 319-332.
- Ridgway, G.J. Polymorphisms in the esterases of Atlantic herring / G.J. Ridgway, S.W. Sherburne, R.D. Lewis // Trans. Amer. Fish. Soc. - 1970. - V. 99. - P. 147-151.
- Vallejos, C.E. Enzyme activity staining / C.E. Vallejos // Isozymes in plant genetics and breeding / Ed. by S.D. Tanksley, T.J. Orton.- Amsterdam: Elsevier Sci.Publ., 1983. – P. 469-516.

Поступила в редакцию 18 января 2012 г.
Принята к печати 1 марта 2012 г.