

УДК 630.232+631.527+ 631.523+582.47

ПОЭТАПНАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ДЕРЕВЬЕВ НА КЛОНОВЫХ ПЛАНТАЦИЯХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ФЕНЕТИКИ

Л.И. Кальченко¹, В.В. Тараканов²¹Филиал ФГУ «Рослесозащита» «Центр защиты леса Алтайского края»²Западно-Сибирский филиал ИЛ СО РАН
630082, Новосибирск, ул. Жуковского, 100/1; e-mail: tarhan8@mail.ru

Генетическую паспорттизацию деревьев на клонных плантациях лесобразующих видов предложено проводить в 2 этапа: «фенетический» и «генетический». Поэтапная паспорттизация сокращает затраты на её проведение приблизительно на порядок. В качестве примера описана схема первого (фенетического) этапа паспорттизации деревьев на клонных плантациях сосны *Pinus sylvestris* L. При апробации подхода, осуществленного на 3-х клонных плантациях сосны в Алтайском крае, выявлено, что доля не привитых деревьев варьирует в пределах 0,0-17,0 %, а доля ошибочно маркированных привоев – 2,0-12,6 %. Между обследованными плантациями обнаружены достоверные различия в частоте фена третьего окрасочного слоя семян, маркирующего популяционный уровень.

Ключевые слова: генетическая паспорттизация, фены окраски семян и шишек, клоны, сосна обыкновенная

The authors recommend doing a genetic certification of trees on clonal plantations of target species in 2 stages: «phenetic» and «genetic». Gradual certification reduces expenses for its carrying out approximately in 10 times. As an example the scheme of the first (phenetic) stage of certification of trees on clonal plantations of *Pinus sylvestris* L is described. It is revealed that in 3 clonal pine plantations in Altay territory the frequency of not graftling trees is being within the limits of 0,0-17,0 %, and a frequency of wrongly marked graftling trees - 2,0-12,6 %. The clonal plantations are significantly differing on the frequency of “color of seeds” phen, which mark a population level.

Key words: genetic certification, phens of color of seeds and cones, clones, *Pinus sylvestris*

ВВЕДЕНИЕ

Некоторые лесные генетики и селекционеры правомерно заостряют вопрос о необходимости паспорттизации лесосеменных плантаций (ЛСП). Однако, не менее важной задачей, которая должна решаться на первом этапе этой работы, является проверка точности маркировки всех деревьев на ЛСП и в архивно-маточных плантациях. Без уборки «генетического мусора» на объектах дальнейшая селекция невозможна, а их паспорттизация не имеет смысла. Для идентификации генотипов предлагается использовать методы биохимической и молекулярной генетики. Эти методы точны, но дорогостоящи. Для снижения себестоимости и ускорения процесса паспорттизации деревьев на клонных плантациях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) нами разработан подход с применением на первом этапе методов фенетики, на заключительном – методов биохимической и (или) молекулярной генетики. Фенетическая характеристика клонов дает также ценный материал о степени генетических различий между селектируемыми популяциями. Цель работы заключалась в разработке схемы поэтапной паспорттизации деревьев на клонных плантациях сосны и апробации её «фенетического» этапа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на клонных плантациях плюсовых деревьев сосны в Озерском лесничестве Алтайского края. Суммарная площадь плантаций 11,5 га, число клонов 118, общее число деревьев 1668, в том числе привитых 1462 (табл. 1).

Таблица 1 - Общая характеристика изученных клонных плантаций сосны

Показатель	АК-96	ЛСП-88	ЛСП-80	Итого
Площадь, га	6,0	3,0	2,5	11,5
Число клонов, шт.	48	47	23	118 (103*)
Число деревьев:				
- Не привитых, шт. (%)	157 (17,2)	59 (10,5)	0 (0,0)	216 (12,9)
- Привитых, шт. (%)	755 (82,8)	501 (89,5)	196 (100,0)	1452 (87,1)
- Итого, шт. (%)	912 (100,0)	560 (100,0)	196 (100,0)	1668 (100,0)

Примечание: в этой и следующих табл. АК-96 – архив клонов 1996 г. закладки, ЛСП-88 и ЛСП-80 – лесосеменные плантации 1988 и 1980 гг. закладки; * - число клонов с учетом «дублирующихся» номеров.

Плантации созданы посадкой привитых 3 – 4 - летних саженцев с размещением 6*8 м (208 шт./га) по стандартной технологии. Анализ фенов окраски генеративных органов сосны осуществляли по методике А.И. Видякина (2004). Кроме фенов учитывали резкие отклонения количественных признаков габитуса кро-

* Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта СО РАН № 53

ны, «скученности» шишек на побегах, типа сексуализации и др.

Авторы выражают благодарность А.И. Видякину за обучение методике выявления фенотипов и В.М. Тюпиной за помощь в камеральной обработке материалов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке метода фенетической паспортизации исходили из опыта создания клоновых плантаций плюсовых деревьев основных лесобразующих видов в Сибири, результатов их инвентаризации, и результатов предыдущих исследований (Пугач, 1982; Андришкявичене, 1983; Кострикин и др., 1999; Тараканов, Демиденко, 1999). Существенными особенностями клоновых плантаций, которые необходимо учитывать для оптимизации процедуры генетической паспортизации деревьев, являются: 1) наличие непривитых деревьев неизвестного генотипа, что обусловлено отмиранием привоев, посадкой семян плюсовых деревьев взамен отмерших привитых саженцев при дополнениях, ошибками при посадке; на изученных нами объектах доля непривитых деревьев варьировала в пределах 0-17,2 % (см. табл. 1); 2) наличие основной и нескольких дополнительных посадок, производимых взамен отмерших деревьев; в связи с этим на каждый объект может быть составлено несколько схем размещения.

В соответствии с этими особенностями, необходимостью снижения трудозатрат и спецификой учета фенотипов работа была организована в несколько этапов: 1) анализ имеющихся схем размещения и паспортов для составления «рабочей схемы», на которой выделяются деревья основной и всех дополнительных посадок; 2) проверка идентичности схемы натурному размещению деревьев; нанесение на неё отмерших, непривитых и больных (подлежащих удалению), а также деревьев с угнетенными привоями; при наличии бирок с номерами – выделение деревьев с несовпадающими номерами на схемах и на бирках; 3) учет фенотипов генеративных органов – окраски мужских колосков, окраски и типа апофизов семенных чешуй зрелых шишек, а также других характерных морфологических особенностей, анализ которых может быть осуществлен непосредственно в полевых условиях; 4) выделение на схемах «типичных» (идентичных по фенотипу) и «нетипичных» (не похожих на типичных представителей клона) рамет; 5) сбор образцов зрелых шишек с «типичных» и «нетипичных» рамет; 6) анализ фенотипов окраски семян и уточнение результатов идентификации; 7) составление фенетических паспортов клонов.

Работу по фенетической паспортизации удобно проводить по отдельным плантациям. В этом случае идентификация рамет осуществляется только внутри клонов на анализируемой плантации. На следующем этапе возможно сравнение выделенных одноименных клонов на разных объектах.

Особого пояснения требуют этапы фенетической паспортизации «4» и «5».

Прежде чем приступить к этим пояснениям,

отметим, что анализ сходства рамет легче осуществляется при рядовом смешении клонов. При случайном смешении для экономии времени выбираются ряды, в которых преобладают определенные наборы клонов из 5 - 6 номеров. На каждый клон необходимо иметь по маленькому мешочку, в который будут складываться типичные шишки (по 1 на рамету). Для работы с шишками необходимо иметь выструганную легкую дощечку размером около 40*10 см, к которой привязывается нашейная лямка. Дощечка удерживается нашейной лямкой на уровне груди. На ней фиксируются крепления из обычной бельевой резинки для 10-12 шишек (рис.). Над и под местами крепления шишек оставляются места для подписей (номера клонов, рядов-строк схемы). Подпись делается простым карандашом, стирается резинкой. Типичные раметы помечаются на схеме символом «=», нетипичные символом «≠» или «НТ». С нетипичных рамет шишки складываются для анализа семян в отдельный мешочек 10*5 см с соответствующей этикеткой. Необходимо отметить, что с небольшой частотой порядка 1 % встречаются ситуации, когда по фенотипу окраски и строения апофизов шишек нельзя с уверенностью отнести рамету в ту или иную категорию. В этом случае ставится знак «~» или «?» и шишка с данной раметы также кладется в отдельный мешочек для анализа фенотипов окраски семян. Кроме этого, часть рамет не может быть идентифицирована по причине отсутствия генеративных органов, а также в ситуации, когда на плантации встречается одна единственная рамета данного клона.



Рисунок - Устройство для закрепления и переноски шишек при анализе сходства деревьев по фенотипу шишек в полевых условиях

На этапе «5» теоретически возможен сбор индивидуальных образцов шишек с каждой раметы. Но это сделает анализ очень трудоемким (число образцов будет равно числу привитых деревьев). Наш опыт показывает, что его можно сильно упростить без потери качества за счет анализа смешанных образцов. Это достигается тем, что на каждую совокупность «типичных» рамет формируется один образец шишек, в который включается по одной шишке с каждой из рамет. (Важно включить в образец все раметы, идентифицированные на этом этапе как идентичные!). Такой подход резко (обратно -

пропорционально среднему числу рамет в клонах) уменьшает число образцов. При анализе семян, полученных из смешанной партии шишек, в случае однородности партии делается вывод об идентичности рамет не только по ранее изученным признакам, но и по фенам окраски семян. При неоднородности выборки (наличие семян с различными фенетическими характеристиками) придется повторить сбор шишек с рамет данного клона.

Но в этом случае сбор и анализ осуществляются уже индивидуально с каждой раметы, а не в смешанном образце. Последняя ситуация при наличии опыта идентификации встречается редко. В нашей практике она имела место с частотой 1 клон из 91 проанализированных. Это свидетельствует о высокой эффективности идентификации уже в полевых условиях. Поэтому предлагаемый метод анализа фенов окраски семян по смешанным образцам, необходимый для повышения точности идентификации и составления «фенетического портрета», может существенно снизить стоимость фенетического анализа.

После описания особенностей разработанного нами подхода изложим основные результаты, полученные при его апробации.

Прежде всего отметим, что в наших исследованиях впервые получены данные о частотах фенов генеративных органов (выделенных в строгом соответствии с критериями А.И. Видякина, 2004) на

клоновых плантациях сосны в Приобских борах. Частота фенов окраски шишек и микростробиллов довольно стабильно воспроизводится на разных плантациях (табл. 2). Однако по фенам окраски семян 1-го и 3-го слоев имеют место статистически значимые различия между плантациями. Поскольку плантации представлены выборками клонов плюскдеревьев из разных лесхозов, то полученный результат подтверждает предположения о сложной популяционной структуре сосновых боров Алтая.

Другой интересный результат из данных таблицы 2 заключается в том, что использованный подход позволил проанализировать 91 клон из 118, представленных на плантациях (сравни с табл. 1) – т.е. 77 % выборки клонов. По мере анализа других плантаций этот показатель возрастет, поскольку клоны, представленные на изученных объектах одной единственной раметой, будут идентифицированы при сравнении с одноименными клонами на других объектах. Вероятно, фенетической паспортизацией может быть охвачено свыше 80 % клонов, за исключением неплодоносящих и клонов с нечетко идентифицируемыми фенами шишек.

Что касается оценок достоверности маркировки родословных деревьев на изучаемых объектах, то из 1452 проанализированных привитых деревьев удалось диагностировать 92,2 % (табл. 3). При этом лишь 4 % из них оказались неверно маркированными. Эта цифра внушает некоторый оптимизм.

Таблица 2 – Распределение клонов по фенам окраски семян, шишек и микростробиллов на плантациях сосны (%)

Планта-ция	Число кло-нов	Фены окраски семян			Фены окраски шишек					Желтый цвет мик-стро-биллов
		Черный цвет 1-го ОС	Пятни-стость 2-го ОС	Наличие 3-го ОС	Беже-вая	Бурая	Серая	Беже-во-бурая	Серо-беже-вая	
АК-96	42	42,9	69,1	47,6	57,1	19,1	16,7	7,1	0,0	-
ЛСП-88	34	55,9*	73,5	70,6*	50,0	20,6	17,7	8,8	2,9	82,4
ЛСП-80	15	80,0	60,0	33,3	46,7	20,0	20,0	13,3	0,0	87,0
Среднее	91	53,9	69,2	53,8	52,7	19,8	17,6	8,8	1,1	82,4

Примечание: ОС – окрасочный слой, * - статистически значимые различия в частоте фена между плантациями по критерию χ^2 ($P < 0,05$).

Таблица 3 - Соотношение различных категорий привитых деревьев, идентифицируемых методами фенетики на клоновых плантациях сосны

Идентификационная категория привитых деревьев	АК-96		ЛСП-88		ЛСП-80		Итого	
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%
Не идентифицированные	45	6,0	61	12,2	7	3,6	113	7,8
Ошибочно маркированные	15	2,0	18	3,6	25	12,6	58	4,0
Верно маркированные	695	92,1	422	84,2	166	83,8	1283	88,2
Итого	755	100,0	501	100,0	198	100,0	1452	100,0

Однако необходимо учесть, что, во-первых, даже и при 4 % ошибок без идентификации родословных дальнейшая селекция невозможна, поскольку любая вероятность ошибки в селекционном процессе должна быть полностью исключена.

Во-вторых, доля неверно маркированных деревьев на отдельных объектах достигает 12,6 %. В-третьих, клоновые плантации 1980 и 1988 гг. являются показательными объектами, на которых научными сотрудниками Института леса СО РАН совместно с Центром защиты леса по Алтайскому краю отработывались методы «селекционного ре-

монта» и селективного изреживания плантаций, при которых непривитые, большие, «сомнительные» и неверно маркированные деревья были удалены при изреживании или по возможности заменены на лучшие достоверно маркированные экземпляры (Тараканов и др., 2001). В - четвертых, на архиве клонов еще не проводились дополнения взамен отпавших деревьев, во время которых преимущественно и возникают ошибки в маркировке (Тараканов, Демиденко, 1999). В-пятых, мы не осуществляли оценку идентичности одноименных клонов с разных плантаций, а также не проводили

этап паспортизации методами биохимической генетики. Поэтому, к сожалению, полученный результат показывает лишь нижний предел ошибок в маркировке родословных на производственных генетико-селекционных объектах единого генетико-селекционного комплекса

В заключение обсудим вопрос о том, как можно использовать данные фенетической диагностики для снижения затрат на этапе паспортизации методами генетики. Этот этап все равно придется проводить по двум причинам: 1) из-за необходимости абсолютного исключения ошибок в маркировке родословных у деревьев, намечаемых для дальнейших селекционно-генетических манипуляций; 2) из-за ценности генетической информации, которая может быть получена и дополнительно использована в селекционном процессе.

Исходя из этого постулата, определенной надежности этапа фенетической паспортизации, и необходимости сокращения затрат, мы предлагаем проводить генотипирование клонов в выборках идентичных по фенам прививок следующим образом. Выборку «типичных» рамет каждого клона разделить на 2 неравных совокупности. В первую из них включить одну из «типичных» рамет, а во вторую все остальные «типичные» раметы. Соответственно, для генетического анализа будут взяты 2 образца фитомассы: 1) образец фитомассы с одной типичной раметы анализируемого клона; 2) смешанный образец фитомассы со всех остальных «типичных» и равно представленных в образце рамет этого клона. В подавляющем большинстве анализ этих образцов будет давать идентичный результат, что подтвердит надежность идентификации и существенно сократит затраты. В случае различий между образцами анализу придется подвергать каждую рамету.

В этом случае затраты можно уменьшить, подвергнув индивидуальной генетической идентификации только фенотипически лучшие экземпляры. Что касается неидентифицируемых методами фенетики и «нетипичных» деревьев, то нам представляется, что с практической точки зрения, из этой группы для дальнейшего исследования стоит отобрать лишь те, которые по их фенотипу могут представлять ценность или с точки зрения селекции, или с точки зрения фундаментальных исследований. Поскольку в среднем на клоновых плантациях приобской сосны каждый клон представлен примерно 30-40 раметами, то предложенный под-

ход снизит затраты на генотипирование клонов примерно в $(30/2) = 15$ раз, или не менее чем на порядок.

ВЫВОДЫ

1. Разработана схема генетической паспортизации деревьев на клоновых плантациях сосны *Pinus sylvestris* L., включающая 2 этапа: «фенетический» и «генетический». Поэтапная паспортизация сокращает затраты на её проведение приблизительно на порядок.

2. При апробации подхода, осуществленного на 3-х клоновых плантациях сосны в Алтайском крае, выявлено, что доля не привитых деревьев варьирует в пределах 0,0-17 %, а доля ошибочно маркированных привоев – 2,0-12,6 %. Составлены фенетические паспорта 91 клона.

3. Между обследованными плантациями обнаружены достоверные различия в частоте фена третьего окрасочного слоя семян, маркирующего популяционный уровень.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Андрюшкявичене, И.С. Первичная оценка клонов на лесосеменных плантациях сосны // Всес. совещ. по лесной генетике, селекции и семеноводству / И.С. Андрюшкявичене // - Петрозаводск, 1983. - С. 74-75.
- Видякин, А.И. Методические рекомендации по выделению фенотипических признаков древесных растений (на примере сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L.) / А.И. Видякин // - Воронеж: НИИЛГиС, 2004. - 17 с.
- Кострикин, В.А. Опыт идентификации сосны обыкновенной на архивно-маточной плантации Семилукского питомника / В.А. Кострикин, Е.А. Пугач, Н.В. Бытченко, И.Е. Пугач // Генетико-селекционные основы улучшения лесов: Сб. науч. тр. – Воронеж: НИИЛГиС, 1999. – С. 205-216.
- Пугач, Е.А. К методике изучения морфологических признаков у сосны обыкновенной / Е.А. Пугач // Генетические основы лесной селекции и семеноводства. - Воронеж: ЦНИИЛГиС, 1982. - С. 85-92.
- Тараканов, В.В. Надежность маркировки родословных на клоновых плантациях хвойных Западной Сибири / В.В.Тараканов, В.П. Демиденко // Генетико-селекционные основы улучшения лесов: Сб. науч. тр. - Воронеж: НИИЛГиС, 1999. - С. 216-223.
- Тараканов, В.В. Селекционное семеноводство сосны обыкновенной в Сибири / В.В. Тараканов, В.П. Демиденко, Я.Н. Ишутин, Н.Т. Бушков. - Новосибирск: Наука, 2001. - 230 с.

Поступила в редакцию 24 октября 2009 г.
Принята к печати 25 февраля 2010 г.