

УДК 575.174.015.3: 674.031.632.26
DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-79-83

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛОНОВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) ДУБРАВЫ ШИПОВ ЛЕС

Равиль Мингазович Камалов, Марта Юрьевна Петюренко

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

г. Воронеж, ул. Ломоносова, д.105

E-mail: kamalov.r.m12@gmail.com

Дуб является одной из наиболее ценных лесных пород на всей Европейско-Уральской части России и имеет большое экономическое значение. К настоящему времени были разработаны серии SSR-маркеров, впоследствии успешно примененные для изучения генетической структуры популяций этого вида. Однако следует отметить, что отечественный генофонд дуба черешчатого еще недостаточно в полном объеме изучался с использованием современных молекулярно-генетических подходов. В нашем исследовании с применением микросателлитного анализа изучена генетическая изменчивость 25 SSR-локусов клонов дуба черешчатого из дубравы Шипов лес на лесосеменной плантации в Воронежской области. Как и предполагалось, все изучаемые SSR-локусы оказались эффективными по выявлению полиморфизма ДНК. Они обладали высоким коэффициентом полиморфизма, а также высоким показателем ожидаемой гетерозиготности (H_e) – от 0,410 до 0,828. Из протестированных микросателлитных локусов для ядерной части ДНК (nSSRs) наиболее полиморфными оказались локусы ZAG4, ZAG5, ZAG7, ZAG39, ZAG65, ZAG75, ZAG87, ZAG110, ZAG112, а также локус PIE243 в транскрибируемой части ДНК (EST-SSRs). Для дуба черешчатого на клоновой ЛСП в целом выявлен более высокий уровень ожидаемой гетерозиготности (H_e) по сравнению с наблюдаемой (H_o), что указывает на дефицит гетерозигот относительно ожидаемого распределения по закону Харди-Вайнберга. Основные средние генетические параметры в дубраве «Шипов лес» составили: H_e и H_o равны соответственно 0,623 и 0,141, $p_e = 3,067$, индекс фиксации Райта = 0,765. Полученные данные позволяют оценить особенности генетического разнообразия клонов дуба ценного лесного массива естественного происхождения на юге Воронежской области для рационального использования в практике лесовосстановления. Полученные параметры изменчивости дуба в Шиповом лесу по молекулярным маркерам оказались чуть ниже, чем у популяций дуба из краевых популяций Южно-Уральского региона, но несколько выше, чем у дуба в Республике Марий Эл, Беларуси.

Ключевые слова: дуб черешчатый; микросателлитные маркеры; полиморфизм; генетическое разнообразие

Введение

Дубравы лесостепи юга Европейской части России являются источниками ценного лесного генофонда требующего всестороннего изучения. Данные о генетической изменчивости дуба в этом регионе полученные к настоящему времени нельзя считать достаточными для решения на научной основе вопросов лесной генетики и селекции, программ лесовосстановления и мониторинга [3]. В настоящее время трудно переоценить значение популяционно-генетических исследований для сохранения биологического разнообразия и его воспроизводства при хозяйственном использовании [1]. Уровень генетической изменчивости популяций напрямую связан с их способностью к адаптации в меняющихся условиях среды, устойчивостью к вредителям и болезням и, тем самым, - с жизнеспособностью. В настоящее время оценка уровней генетической изменчивости и её популяционной структуры лесообразующих видов может проводиться с использованием 2-х основных методов: а) закладка и анализ испытательных культур; б) использование молекулярных маркеров. В изучении популяционно-генетического разнообразия древесных растений, активно применяются микросателлитные локусы (SSR-маркеры), позволяющие

проводить разносторонние исследования генетической изменчивости видов, в том числе и рода *Quercus* [4-11].

Цель работы – изучение генетической изменчивости SSR-маркеров для характеристики генетического разнообразия клонов *Quercus robur* L., являющихся потомством плюсовых деревьев Шипова леса и произрастающих на лесосеменной плантации (ЛСП) в Воронежской области.

Материалы и методика

Объект исследования представлен клоновой плантацией дуба черешчатого (объект №80), заложеной в 1982 г. в Семилукском лесном селекционном опытно-показательном питомнике Воронежской области. Площадь ЛСП 2,5 га. Привойным материалом служили черенки, заготовленные с клонов ЛСП 1976 и 1977 гг. закладки, отобранных по признаку обильного и синхронного цветения [5]. В рамках исследования была проведена работа по тестированию 25 микросателлитных локусов у рамет клонов под номерами: 1, 8, 9, 20, 26, 36, 42, 54, 60, 64, 65а, 69а, 100, 101, 111, 129, 131, 131а, 139а.

Образцы листьев дуба хранили до анализа в морозильнике при –80°C для предотвращения возможности разрушения ДНК в процессе замораживания-оттаивания. Выделение ДНК из вегетативных тканей дуба черешчатого проводили с применением СТАВ-буфера [6]. Полученные препараты нуклеиновой кислоты хранили в холодильнике при +4°C, не замораживая. SSR-анализ проводили по 25 микросателлитным локусам (8 экспрессирующихся EST-SSR локусов: PIE152, PIE215, PIE223, PIE242, PIE243, PIE258, PIE267, PIE27; 17 ядерных pSSR локусов MSQ4, MSQ13, ZAG4, ZAG5, ZAG7, ZAG9, ZAG11, ZAG15, ZAG20, ZAG36, ZAG39, ZAG 65, ZAG75, ZAG87, ZAG96, ZAG110, ZAG112) [9, 10, 11]. ПЦР проводили в термоциклере CFX96 BIO-RAD, США. Для постановки ПЦР реакции использовали готовую смесь для ПЦР ScreenMix-HS (Евроген, Россия) содержащую 40-50 нг геномной ДНК. Детекцию результатов ПЦР проводили в 3% агарозе MS-12. Распознавание размера продуктов амплификации на электрофореграмме осуществлялось при помощи программного обеспечения «Labimage», version: 4.2.3 (<http://www.kapelanbio.com/>). Расчеты показателей внутривидовой изменчивости по SSR-локусам были проведены с использованием надстройки для MS Excel GenAlEx 6.503.

Результаты и обсуждение

В рамках выполнения государственного задания под руководством И.И. Камаловой в связи с высокой ценностью объекта ранее проводилось комплексное исследование клонов плюсовых деревьев дуба черешчатого из Шипова леса. Авторами для 18 рамет клонов (№№ 8, 9, 20, 26, 36, 42, 54, 60, 64, 65а, 69а, 100, 101, 111, 129, 131, 131а, 139а) на основании ферментных систем были рассчитаны показатели индивидуальной гетерозиготности и ростовые показатели у клонов дуба, а также начаты работы по изучению генетико-экологических параметров признаков общей продуктивности дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) популяции "Шипов лес" [2]. Как упоминалось выше, в связи с высокой ценностью объекта на изучаемой клоновой лесосеменной плантации нами была продолжена работа по изучению генетической изменчивости клонов дуба черешчатого дубравы Шипов лес, но уже с использованием более современных SSRs-локусов.

По данным Ю.П. Ефимова на ЛСП средние показатели роста потомств плюсовых деревьев не отличаются от роста потомств контроля [5], что позволяет рассматривать выборку материнских плюсовых деревьев как несмещенную случайную выборку нормально-лучших деревьев из популяции Шипов лес. Поэтому полученные

нами на опытном участке комплексные оценки генетической изменчивости можно интерпретировать как оценки внутривидовой генетической изменчивости дуба черешчатого в дубраве «Шипов лес», плюсовые деревья которой являются материнскими для клонового потомства изученной ЛСП дуба.

Молекулярно-генетический анализ 25 микросателлитных локусов у 19 клонов дуба черешчатого на лесосеменной плантации показал их высокую изменчивость. В исследуемом насаждении на клоновой ЛСП наиболее эффективными по выявлению полиморфизма ДНК оказались ядерные микросателлитные маркеры ZAG4, ZAG5, ZAG7, ZAG39, ZAG65, ZAG75, ZAG87, ZAG110, ZAG112, PIE243, позволяющие выявить от 5 до 8 аллелей на локус. При этом наибольшее значение эффективного числа аллелей (n_e) выявлено у локусов ZAG4, ZAG5, ZAG7, ZAG75, PIE243. Эти локусы также обладали самым высоким значением ожидаемой гетерозиготности (H_e) – от 0,654 до 0,828. Из 25 стабильно амплифицирующихся микросателлитных локусов 8 (PIE152, PIE215, PIE258, PIE267, PIE271, MSQ4, MSQ13, ZAG20) на исследованных образцах не показали высокого полиморфизма ДНК, выявляя по 2 аллеля в локусе. Самый низкий уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o) отмечен для локусов ZAG5, ZAG9, ZAG36, ZAG65, ZAG112, PIE215, MSQ13.

Полокусное сравнение величин индекса фиксации Райта (F), характеризующего уровень равновесия генетической структуры, показало, что из всех 25-ти исследованных локусов только генетическая структура локуса PIE223, относящегося к транскрибируемому EST-SSRs, находится в состоянии близком к равновесному ($F_{PIE223} = 0,078$). У всех остальных SSRs-локусов имеется существенный недостаток гетерозиготности (показатель F варьирует от 0,078 до 1,000). Столь высокие значения этого параметра, сказались на средних величинах F в таблице 1.

Таблица 1

Основные средние генетические параметры SSRs-локусов на клоновой ЛСП дуба черешчатого по 25 локусам

Локусы	Кол-во локусов	P_{95} , %	A	n_e	H_o	H_e	F
EST-SSRs, nSSRs	25	100,0	4,300	3,067	0,141	0,623	0,765

Примечание: A – среднее число аллелей на локус, n_e – эффективное число аллелей на локус, H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности, F – индекс фиксации Райта.

Таким образом, для дуба черешчатого выявлен более высокий уровень ожидаемой гетерозиготности (H_e) по сравнению с наблюдаемой (H_o), что указывает на дефицит гетерозигот относительно ожидаемого распределения по закону Харди-Вайнберга. Полученные параметры изменчивости дуба в Шиповом лесу по молекулярным маркерам ниже, чем у популяций дуба из типичных для вида экологических условий и краевых популяций Южно-Уральского региона, но выше, чем у дуба в Республике Марий Эл, Беларуси, Ростовской области, а также малых по объёму географически изолированных дубрав и из экологически пессимальных условий местообитания.

Заключение

В целом, на основе полученных результатов можно заключить, что все 25 изученных микросателлитных локусов, включенных в исследование, подходят для генетических исследований дуба черешчатого и могут давать важную информацию о внутривидовом генетическом разнообразии вида. Тем не менее, желательно проводить исследования совместно с фенотипическими хозяйственно-важными признаками.

Полученные оценки изменчивости молекулярных маркеров у клонов также могут служить важными показателями внутривидовой генетической изменчивости. В дальнейшем планируется совмещать исследования генетической изменчивости молекулярных маркеров с исследованиями генетической изменчивости количественных хозяйственно-важными признаков

Список литературы

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – М.: Наука, 1989. – 328 с.
2. Камалов Р.М., Камалова И.И. Генетико-экологические параметры признаков общей продуктивности дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) популяции "Шипов лес" // Генетика популяций: прогресс и перспективы. Сборник материалов Международной научной конференции, посвящённой 80-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова и 45-летию основания лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова. – Звенигород: Ваш Формат, 2017. – С. 117-118.
3. Кострикин В.А. К вопросу о генофонде дубрав // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. – 2013. – № 4. – С. 138-142.
4. Кулаков Е.Е., Воробьева Е.А., Сиволопов В.А., Карпеченко Н.А. Оценка полиморфизма дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) с помощью SSR-анализа // Лесной вестник. – 2021. – Т. 25. – № 4. – С. 44-51.
5. Опытнo-производственные селекционнo-семеноводческие объекты НИИЛГиС: Сб. науч. трудов. – Воронеж: НИИЛГиС. – Т.2. – 2004. – 196 с.
6. Петюренко М.Ю. Сравнение эффективности выделения ДНК из *Quercus robur* L. с помощью коммерческих наборов реагентов // ФГБУ «ВНИИЛГИСБиотех» – Наука и практика. Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии. – М.: «Перо», 2021. – С. 214-223.
7. Янбаев Р.Ю., Деген Б., Янбаев Ю.А. Микросателлитные локусы: эффективный инструмент решения практических вопросов восстановления дубрав на Южном Урале // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2017. – № 1(41). – С. 115-118.
8. Янбаев Р.Ю., Бахтина С.Ю., Тагиров В.В., Янбаев Ю.А. Молекулярно-генетические исследования дуба черешчатого: перспективы применения результатов в практике лесного хозяйства // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2022. – № 1(61). – С. 64-71.
9. Durand J., Bordenes C., Chancerel E. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study // BMC Genomics. – 2010. – No. 11. – P. 570-573.
10. Kampfer S., Lexer Ch., Glössl J., Steinkellner H. Characterization of (GA)n microsatellite loci from *Quercus robur* L. // Hereditas. – 1998. – No. 129. – P. 183-186.
11. Steinkellner H., Fluch S., Turetschek E. Identification and characterization of (GA/CT) n- microsatellite loci from *Quercus petraea* L. // Plant Molecular Biology. – 1997. – No. 33. – P. 1093-1096.

Статья поступила в редакцию 12.07.2022 г.

Kamalov R.M., Peturenko M.Yu. Genetic variability of clones of English oak (*Quercus robur* L.) from Shipov forest // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 145- P. 80-83

Oak is one of the most valuable forest species throughout the European-Ural part of Russia and is of great economic importance. To date, a series of SSR markers have been developed, which were subsequently successfully applied to study the genetic structure of populations of this species. However, it should be noted that the domestic gene pool of English oak has not yet been studied in full using modern molecular genetic approaches. In our study, using microsatellite analysis, we studied the genetic variability of 25 SSR loci in

English oak clones from the "Shipov Les" oak forest on a forest seed plantation in the Voronezh region. As expected, all studied SSR loci were effective in detecting DNA polymorphism. They had a high coefficient of polymorphism, as well as a high indicator of expected heterozygosity (H_e) - from 0.410 to 0.828. Of the tested microsatellite loci for the nuclear part of DNA (nSSRs), the most polymorphic loci were ZAG4, ZAG5, ZAG7, ZAG39, ZAG65, ZAG75, ZAG87, ZAG110, ZAG112, as well as the PIE243 locus in the transcribed part of DNA (EST-SSRs). For pedunculate oak on clonal LSP, in general, a higher level of expected heterozygosity (H_e) compared to observed (H_o) was revealed, which indicates a deficit of heterozygotes relative to the expected distribution according to the Hardy-Weinberg law. The main average genetic parameters in the oak forest "Shipov Les" were: H_e and H_o equal to 0.623 and 0.141, respectively, $n_e = 3.067$, fixation index $F = 0.765$. The data obtained make it possible to evaluate the features of the genetic diversity of clones of a valuable forest massif of natural origin in the south of the Voronezh region for rational use in reforestation practice. The obtained parameters of the variability of oak in the "Shipov Les" by molecular markers turned out to be slightly lower than in oak populations from the marginal populations of the South Ural region, but slightly higher than in oak in the Republic of Mari El, Belarus.

Key words: *Guercus Robur L.*; microsatellite markers; polymorphism; genetic diversity

УДК 582.475:630*232(477.75)

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-83-88

ПОГОДНЫЕ УСЛОВИЯ И ФЕНОЛОГИЯ ВЫЛЕТА ПЫЛЬЦЫ *PINUS BRUTIA* VAR. *PITYUSA* (STEVEN) SILBA

Владимир Петрович Коба, Олеся Олеговна Коренькова,
Никита Александрович Макаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового
Красного знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, спуск Никитский, 52
E-mail: kobavp@mail.ru

Рассмотрены особенности фенологии вылета пыльцы в природных популяциях *Pinus pithyusa* Stev. в Горном Крыму. Показано влияние погодных условий на специфику процесса высывания и распространения пыльцы в западной и восточной части произрастания *Pinus pithyusa*. Выявлено, что ветровой режим в период прохождения фенофазы пыления снижает вероятность успешного опыления древостоев *Pinus pithyusa* западной части г. Караул-Оба, так как, находящаяся в воздухе пыльца с преобладающим движением воздушных масс в большем объеме перемещается в восточном направлении, этому также способствуют более сильные ветры на данных территориях. Отмечено, что в древостоях *Pinus pithyusa* на г. Караул-Оба увеличивается вероятность снижения гетерогенности, что негативно влияет на качество семян и возможности ее семенного возобновления.

Ключевые слова: пыльца; высывание; распространение; погодные условия; поллютанты

Введение

У видов рода *Pinus* L. фаза вылета пыльцы является важнейшим этапом формирования семян. Продолжительность пребывания пыльцы в воздухе, особенности ее распространения определяют не только уровень семенной продуктивности и качество семян, но и в значительной степени влияют на гетерогенность и специфику структуры популяций [3, 6, 12, 13]. В настоящее время развитие мужского гаметофита, его миграция в период лета пыльцы и реализация в последующих этапах репродуктивного цикла зависят не только от природных явлений, но и в значительной степени от антропогенно обусловленных процессов, связанных с глобальными климатическими изменениями и техногенным загрязнением природной среды [9, 10].

У анемофильных растений в период распространения пыльцы повышается риск ее контакта с аэрозолями воздушной среды, которые могут содержать химические вещества