

УДК 575.174.015.3:582.475

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-96-101

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА SSR-ЛОКУСОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ У ПОПУЛЯЦИИ *PINUS SYLVESTRIS* L. В СТЕПНОЙ ЗОНЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ РОССИИ

Марта Юрьевна Петюренко, Алина Петровна Дегтярева

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии» 394087, Россия, г. Воронеж, Воронежская обл., ул. Ломоносова, 105
E-mail: forestgenetic@mail.ru; ali.serdyukova@yandex.ru

В данном исследовании мы сравнили разные варианты оценки влияния полиморфизма SSR-локусов на показатели аллельной и генетической изменчивости в популяции сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Для исследования влияния полиморфизма SSR-локусов на оценки изучаемых параметров аллельного и генетического полиморфизма они были разбиты на 3 группы: общая выборка, состоящая из 14 EST-SSRs и 4 nSSRs локусов (первая группа локусов), выборка из 13 EST-SSRs и 4 nSSRs, исключая 1 мономорфный локус (вторая группа локусов) и выборка из 7 EST-SSRs и 2 nSSRs, исключая локусы, выявившие по 2 аллельных варианта на локус (третья группа). Получены сходные средние оценки аллельной и генетической дифференциации, вычисленные с использованием 18 и 17 EST-SSRs и nSSRs локусов из первой и второй группы: показатель A составил – 3,500 и 3,647, H_e – 2,464 и 2,550 соответственно. В тоже время, анализ параметров аллельного разнообразия образцов сосны из изучаемой популяции показал максимальный уровень полиморфности по 7 EST-SSRs и 2 nSSRs локусам, выявивших в исследовании от 3 аллельных вариантов и более (показатель A составил 5,111, H_e – 3,308). Сходная тенденция в увеличении показателей генетического разнообразия выявлена также для этой группы локусов: показатель ожидаемой гетерозиготности (H_e) равен 0,635. Полученные результаты на примере популяции сосны обыкновенной показывают, что значения аллельного разнообразия напрямую зависят от полиморфности локусов, использованных в исследовании. В связи с этим, для мониторинга состояния генетических ресурсов хозяйственно-ценных древесных пород с применением методов анализа ДНК, на наш взгляд, он должен включать в себя единую панель микросателлитных локусов, с которыми будет работать исследователь при изучении всех выборок в данном регионе или лесосеменном районе для уменьшения ошибки при расчете показателей генетической структуры.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; полиморфизм; микросателлитные локусы; аллельное разнообразие; генетическое разнообразие

Введение

Одним из наиболее часто используемых молекулярных методов оценки внутривидового генетического разнообразия растений является метод SSR-маркирования, основанный на анализе полиморфизма микросателлитных или SSR-локусов. С помощью генетических маркеров проводятся исследования генетического дрейфа, величины генного потока, популяционной структуры и её изменений под влиянием антропогенных и других факторов, влияния экологических условий местопроизрастания, а также вопросы идентификации видов и их филогения [3, 4].

Используемые генетико-статистические параметры должны давать стабильные оценки генетической изменчивости, но, как правило, они зависят от разных факторов, в частности, от процедуры проведения исследований, объема используемых выборок, количества генетических маркеров [1]. Так, например, зависимость влияния величины выборки на результаты оценок генетического разнообразия популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) по изменчивости 12 полиморфных локусов изоферментов и четырех микросателлитных локусов (cpSSR) приведена в работе [6]. Установлено, что увеличение выборки приводит к существенному увеличению показателей разнообразия как по числу аллелей и генотипов. В своей статье на примере

популяции сосны обыкновенной мы решили выяснить как сильно могут варьировать показатели генетической изменчивости в зависимости от полиморфизма SSR-локусов.

Объекты и методы исследования

Исследования были проведены на лесных культурах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (Воронежская область, Кантемировский район, 49°66' с.ш и 39°75' в.д., экологически благоприятная территория). Насажение заложено в 1985 г. по склонам оврагов и балок, имеет 3 бонитет, тип лесорастительных условий – А₁. Объем популяционной выборки – 60 деревьев. Выделение суммарной ДНК из хвои проводили с использованием набора *diaGene* (Диаэм) для растительной ткани по методике [5]. SSR-анализ проводили по 18 SSR-локусам. Таблица 1 содержит основные характеристики используемых локусов.

Таблица 1

Характеристика SSR-локусов сосны обыкновенной

Локус	Мотив ¹	Размер фрагмента, п.н.	Количество аллелей	Литературный источник
lw_isotig04204	(CGGCT) ₅	230	2	[9]
lw_isotig10603	(CAG) ₇	196	2	-«-
lw_isotig17679	(TTAA) ₅	277	3	-«-
lw_isotig21953	(ATGGG) ₇	208	7	-«-
lw_isotig27940	(TGGA) ₅	231	3	-«-
lw_isotig00080	(CCG) ₆	177	3	-«-
lw_isotig00081	(CCG) ₆	290	3	-«-
lw_isotig01420	(CTG) ₅	174	3	-«-
lw_isotig04195	(GAG) ₅	189	4	-«-
lw_isotig04306	(TCC) ₇	196	3	-«-
lw_isotig05123	(GAG) ₆	166	2	-«-
lw_isotig20215	(TA) ₇	186	8	-«-
lw_isotig07383	(GAT) ₈	191	3	-«-
lw_isotig02842	(AGA) ₅	229	2	-«-
PtTx4011	(CA) ₂₀	250-277	-«-	[8]
PtTx4001	(GT) ₁₅	160-187	-«-	-«-
PtTx3107	(CAT) ₁₄	150-177	-«-	-«-
SPAC12.5	(GT) ₂₀ (GA) ₁₀	115-210	-«-	[10]

Примечание: 1 – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; 2 – пар нуклеотидов

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в 25 мкл реакционной смеси ScreenMix-HS (Евроген, Россия) содержащей 50 нг ДНК и по 0,2-0,4 мкМ прямых и обратных праймеров. Процедуры амплификации осуществляли по методикам [8-10]. Результаты амплификации визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 3% агарозе марки MS-12. Распознавание размера продуктов амплификации на электрофореграмме осуществлялось при помощи программного обеспечения «Labimage». Основные статистики оценивались по микросателлитным данным в программе GenAlEx6.503.

Результаты и обсуждение

Анализ 60 деревьев сосны обыкновенной обнаружил значительное генетическое разнообразие по исследуемым локусам. Количество выявленных аллелей составляло от 1 до 12 на локус. Размер амплифицирующихся последовательностей у *Pinus sylvestris* L. по всем 18 микросателлитным локусам был близок к литературным данным. На рисунке приведены примеры электрофореграмм разделения продуктов двух SSR-локусов, характеризующихся разным уровнем изменчивости.

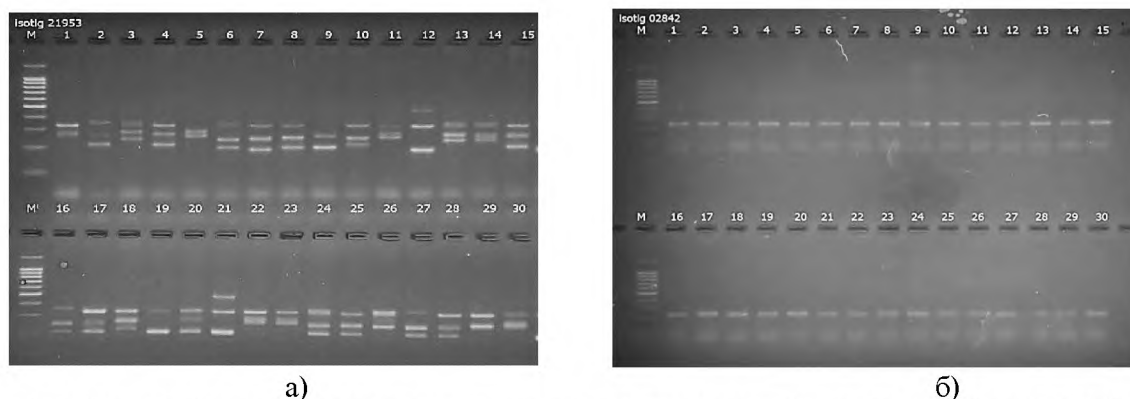


Рис. Электрофореграмма результатов амплификации локусов lw_isotig 21953 (а) и lw_isotig 02842 (б)

Из рисунка видно, что locus lw_isotig02842 в изучаемой популяции оказался мономорфным и имел один аллель размером ориентировочно 229 п. н. Наибольшее аллельное разнообразие было выявлено в локусе lw_isotig21953 (12 аллелей), что подтверждается работами других исследователей: в работе [2] было выявлено 14 аллельных варианта, а в работе [7] – 9 аллелей. Наименее изменчивыми в изучаемой популяции сосны оказались EST-SSR-локусы lw_isotig04306, lw_isotig00081, lw_isotig07383, lw_isotig05123, lw_isotig17679, lw_isotig04195, имеющие по 2 аллеля. Среди nSSRs-локусов наименее изменчивыми были PtTx3107, PtTx4011, имеющие так же по 2 аллельных варианта (табл. 2).

Таблица 2
Показатели полиморфизма SSRs локусов сосны обыкновенной по 18 SSR-маркерам

Локус	A	ne	Ho	He
lw_isotig04306	2	1,763	0,283	0,433
lw_isotig01420	3	1,956	0,050	0,489
lw_isotig27940	8	4,545	0,317	0,780
lw_isotig10603	3	2,198	0,333	0,545
lw_isotig07383	2	1,220	0,117	0,180
lw_isotig20215	4	2,974	0,067	0,664
lw_isotig05123	2	1,724	0,017	0,420
lw_isotig17679	2	1,704	0,217	0,413
lw_isotig0080	4	2,067	0,083	0,516
lw_isotig04195	2	1,744	0,017	0,427
lw_isotig04204	4	2,520	0,467	0,603
lw_isotig02842	1	1,000	0,000	0,000
lw_isotig00081	2	2,000	1,000	0,500
lw_isotig21953	12	8,054	0,550	0,876
SPAC 12.5	4	3,211	0,200	0,689
PtTx4001	4	2,275	0,017	0,560
PtTx4011	2	1,471	0,033	0,320
PtTx3107	2	1,923	0,000	0,480

Примечание: A – среднее число аллелей на локус, ne – эффективное число аллелей на локус, Ho и He – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности.

В нашем исследовании отмечена некоторая разница в количестве аллелей по сравнению с авторами, тестировавшими локусы ранее. Так, например, для локуса *lw_isotig02842* согласно данным *P. fang* и соавторов [9] выявлено 2 аллеля, в нашем исследовании – один. Возможно, это можно объяснить различиями в происхождении образцов деревьев, а также стоит учитывать погрешность агарозного геля, чья разрешающая погрешность не позволяет определять размер продукта до 1 пары нуклеотидов.

Несмотря на то, что локус не выявил полиморфизма между образцами сосны в изучаемом нами насаждении, он может быть полезен при увеличении выборки или смене географического расположения популяций. На основании данных микросателлитного анализа в зависимости от выборки микросателлитных локусов нами были рассчитаны показатели внутривнутрипопуляционной изменчивости (табл. 3).

Таблица 3

Параметры внутривнутрипопуляционной изменчивости сосны обыкновенной в зависимости от полиморфизма SSRs-локусов

Локусы	Кол-во локусов	P ₉₉ , %	A ± SE	n _e ± SE	H _o ± SE	H _e ± SE	F ± SE
14 EST-SSRs, 4 nSSRs	18	94,4	3,500 ± 0,622	2,464 ± 0,380	0,209 ± 0,061	0,494 ± 0,048	0,582 ± 0,115
13 EST-SSRs, 4 nSSRs	17	100,0	3,647 ± 0,641	2,550 ± 0,393	0,222 ± 0,063	0,523 ± 0,041	0,582 ± 0,119
7 EST-SSRs, 2 nSSRs	9	100,0	5,111 ± 0,992	3,308 ± 0,651	0,204 ± 0,066	0,635 ± 0,043	0,706 ± 0,087

Примечание: A – среднее число аллелей на локус, n_e – эффективное число аллелей на локус, H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации Райта, SE – стандартная ошибка среднего, среднее по выборке.

Из таблицы 3 видно, что с увеличением полиморфизма локусов, т.е. с увеличением числа аллелей на локус, наблюдается тенденция и к некоторому завышению показателей аллельного разнообразия (показатели A и n_e). В тоже время, исключение локуса *lw_isotig02842*, имеющего всего один аллель в выборке, привело к незначительному увеличению значения показателя среднего числа аллелей на локус, а также эффективного числа аллелей по сравнению с общей выборкой, включающей все 18 микросателлитных локусов. Количество аллелей на локус (A) составило 3,647, показатель n_e – 2,550. При этом значения показателя наблюдаемой гетерозиготности (H_o) и индекса фиксации Райта оставались примерно на одном числовом уровне. В тоже время, анализ параметров аллельного разнообразия образцов сосны показал максимальный уровень полиморфности по 7 EST-SSRs и 2 nSSRs, выявивших в исследовании от 3 аллельных вариантов и более (A = 5,111, n_e = 3,308). При этом наблюдалась тенденция к увеличению числовых значений ожидаемой гетерозиготности и индекса фиксации Райта (H_e = 0,635, F = 0,706).

Выводы

Полученные нами результаты на примере популяции сосны обыкновенной показывают, что значения аллельного разнообразия зависят от полиморфности локусов, использованных в исследовании. Исключение локусов, выявивших в анализе 1-2 аллеля на локус зависит от целей эксперимента и параметров, которые исследователь хочет рассчитать. Тем не менее, необходимо иметь в виду, что значения показателей генетической изменчивости могут напрямую зависеть от условий эксперимента. Если исследователь при изучении генетической изменчивости определенной популяции

выявляет мономорфный локус, то, на наш взгляд, использование его не является целесообразным, т.к. это приведет к небольшому занижению аллельного разнообразия. В тоже время, если при изучении нескольких популяций в конкретном лесосеменном районе или определенной выборке данный локус проявляет себя одновременно как моно- и полиморфный, это может быть особенностью популяции в данном регионе. В тоже время при отнесении того или иного локуса в популяции к мономорфному необходимо учитывать погрешность того или иного метода, чтобы избежать некорректной интерпретации полученных данных.

Список литературы

1. Галинская Т.В., Щенетов Д.М., Лысенков С.Н. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. – 2019. – Т 55. – №6. – С. 1-16.
2. Калько Г.В. Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2017. – № 1. – С.23-34.
3. Крутовский К.В. От популяционной генетики к популяционной геномике лесных древесных видов: интегрированный популяционно-геномный подход // Генетика. – 2006. – Т. 42. – № 10. – С. 1088-1100.
4. Крутовский К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 11-15.
5. Петуренко М.Ю., Камалова И.И., Сердюкова А.П. Экстракция суммарной ДНК из *Pinus sylvestris* L. при оценке полиморфизма с использованием SSR- и RAPD-маркеров // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2021. – № 3. – С. 13-25.
6. Тихонова И.В., Семерилов В.Л., Семерикова С.А., Дыминакова О.С., Зацетина К.Г. О выборках в исследованиях внутривидового генетического разнообразия сосны обыкновенной // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 99-109.
7. Торбик Д.Н., Бедрицкая Т.В., Власова М.М., Синельников И.Г. Генетическое разнообразие естественных популяций *Pinus sylvestris* // Наука – лесному хозяйству Севера: сборник научных трудов ФБУ «СевНИИЛХ». Отв. ред. Н.А. Демидова. – Архангельск. – 2019. – С. 91-99.
8. Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. Conifer Microsatellite Handbook. – Texas: A & M University, College Station. – 2002. – 57 p.
9. Fang P., Niu S., Yuan H., Li Z., Zhang Y., Yuan L., Li W. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae) // Applications in Plant Sciences. – 2014. – № 2. – P. 1-6.
10. Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. // Molecular Ecology. – 1998. – No. 7(9). – P. 1260-1261.

Статья поступила в редакцию 11.10.2022 г.

Peturenko M.Yu., Degtyareva A.P. Influence of SSR-locus polymorphism on genetic variability indicators in *Pinus sylvestris* L. population in the steppe zone of European Russia // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2022. – № 145. – P. 96-101

In this study, we compared different options for assessing the effect of SSR loci polymorphism on the indicators of allelic and genetic variability in the Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) population growing in the ecologically favorable territory of the steppe zone of European Russia. To study the influence of polymorphism of microsatellite loci on the estimates of the studied parameters, they were divided into 3 groups: a total sample of 14 EST-SSRs and 4 nSSRs of loci (the first group of loci), a sample of 13 EST-SSRs and 4 nSSRs, excluding

1 monomorphic locus (second group of loci) and a sample of 7 EST-SSRs and 2 nSSRs, excluding loci that identified 2 allelic variants each (third group of loci). Similar average estimates of allelic and genetic differentiation were obtained, calculated using 18 and 17 EST-SSRs and nSSRs loci from the first and second groups: A value was 3.500 and 3.647, He – 2.464 and 2.550, respectively. At the same time, the analysis of the parameters of the allelic diversity of pine samples from the studied population showed the maximum level of polymorphism for 7 EST-SSRs and 2 nSSRs loci, which revealed in the study from 3 allelic variants or more (the indicator was A – 5.111, ne – 3.308). A similar trend in the increase in genetic diversity indicators was also revealed for this group of loci: the expected heterozygosity index (He) is 0.635. Our results on the example of the Scotch pine population show that the values of allelic diversity directly depend on the polymorphism of the loci used in the study. In this regard, in order to monitor the state of genetic resources of economically valuable tree species using DNA analysis methods, in our opinion, it should include a single panel of microsatellite loci with which the researcher will work when studying the analysis of all samples in a given region or forest seed area for reducing errors in the calculation of indicators of the genetic structure.

Key words: *Pinus sylvestris* L.; polymorphism; microsatellite loci; allelic diversity; genetic diversity

УДК 581.553

DOI: 10.36305/0513-1634-2022-145-101-109

ПЕТРОФИТНЫЕ ЛУГОВЫЕ СТЕПИ УЧАСТКА «ОГЛАХТЫ» ГОСУДАРСТВЕННОГО ПРИРОДНОГО ЗАПОВЕДНИКА «ХАКАССКИЙ»

Онея Олеговна Порабейкина

Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, Республика Хакасия,
г.Абакан, ул. Ленина, д.92
E-mail: onea90@mail.ru

В результате проведенной классификации петрофитно-степной растительности участка «Оглахты» заповедника «Хакасский» выявлено два варианта сообществ ассоциации *Youngio tenuifoliae* – *Agropyretum cristati* Makunina 2006, различающихся по степени увлажненности экотопов. Вариант *Artemisia martjanovii* включает типичные мезо-ксерофитные сообщества петрофитных степей, а вариант *Stellaria cherleriae* – более мезофитные петрофитно-степные сообщества. Выделенные единицы помещены в союз петрофитных степей *Eritrichio pectinati*–*Selaginellion sanguinolentae* Ermakov et al. 2006, порядок *Festucetalia lenesis* Mirkin in Gogoleva et al. 1987, класс центрально-азиатских степей *Cleistogenetea squarrosae* Mirkin et al. ex Korotkov et al. 1991. Дана характеристика вариантов описанных ассоциаций и приведены закономерности размещения их в рельефе. Отмечена важность представленных сообществ для сохранения разнообразия естественной горно-степной растительности Минусинской межгорной котловины и мониторинга ее состояния.

Ключевые слова: растительность; мониторинг; экология растений; Хакасия; биоразнообразие

Введение

Степные растительные сообщества Минусинской межгорной котловины подверглись значительной антропогенной нагрузке во второй половине XX века в результате сильного влияния различных форм хозяйственной деятельности человека, и прежде всего в результате распашки степей и перевыпаса домашнего скота (Зеленая книга, 1996). Участок «Оглахты», входящий в состав Хакасского государственного природного заповедника, представляет большую важность как эталон естественной горно-степной растительности юга Средней Сибири, при организации системы мониторинга за ее состоянием. В то же время, степная растительность участка «Оглахты» до сих пор не исследовалась в геоботаническом отношении, при том, что данные о разнообразии степей Минусинской межгорной котловины присутствуют во многих научных работах [1-7, 10]. В связи с этим изучение особенностей фитоценотического разнообразия, флористического состава, экологии и