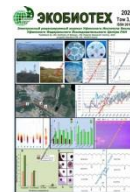




# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО НАБОРА ЛОКУСОВ ОДНОНУКЛЕТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ЛЕСОСЕМЕННОГО РАЙОНИРОВАНИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

Деген Б.1\*, Янбаев Ю.А.2, Янбаев Р.Ю.2,  
Бахтина С.Ю.2, Тагирова А.А.2,3

<sup>1</sup> Институт лесной генетики, Гроссхансдорф (Германия),

<sup>2</sup> Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

<sup>3</sup> Башкирский государственный университет, Уфа (Россия)

\*E-mail: Bernd.Degen@thuenen.de

С целью выявления генетических различий популяций дуба черешчатого в пределах одной лесосеменной зоны проведено тестирование 95 новых, географически информативных локусов однонуклеотидных полиморфизмов дуба черешчатого. При кластерном анализе все особи двух изученных древостоев разделились на собственные группы. Обнаружены статистически значимая генетическая дифференциация популяций (генетическое расстояние  $d_0 = 0,170$ , параметр дифференциации  $\Delta_T = 0,1696$ , генетическая фиксация  $F_{ST} = 0,0687$ ) и более высокая генетическая изменчивость в равнинном насаждении ( $P = 91,58\%$ , наблюдаемая гетерозиготность  $H_0 = 0,364$ , ожидаемая гетерозиготность  $H_E = 0,330$ , разнообразие аллелей  $v_a = 1,58$ ) по сравнению с дубравой Приволжской возвышенности ( $P = 77,89\%$ ,  $H_0 = 0,327$ ,  $H_E = 0,272$ ,  $v_a = 1,47$ ). Сделан вывод, что эти дубравы должны относиться к разным лесосеменным зонам. Продолжение исследований с использованием этого набора локусов SNP и расширение набора изучаемых популяций может помочь обеспечить лесное хозяйство России генетической информацией для оптимизации лесосеменного районирования черешчатого дуба.

**Ключевые слова:** популяция, *Quercus robur*, лесосеменные зоны, однонуклеотидный полиморфизм

## ON THE POSSIBILITY OF APPLYING A NEW SET OF SINGLE-NUCLEIC POLYMORPHISMS LOCI TO THE OPTIMIZATION OF THE FOREST SEED AREA OF PEDUNCULATE OAK

Degen B.1\*, Yanbaev Y.A.2, Ianbaev R.Y.2,  
Bakhtina S.Y.2, Tagirova A.A.2,3

<sup>1</sup> Institute of Forest Genetics, Grosshansdorf (Germany),

<sup>2</sup> Bashkir State Agrarian University, Ufa (Russia),

<sup>3</sup> Bashkir State University, Ufa (Russia)

\*E-mail: Bernd.Degen@thuenen.de

We tested 95 new, geographically informative nuclear SNP loci of pedunculate oak in order to identify genetic differences of populations in the same seed zone. In a cluster analysis all individuals of the two studied stands are divided into two distinct groups. We observed statistically significant genetic differentiation of two populations (genetic distance  $d_0 = 0.170$ , parameter of differentiation  $\Delta_T = 0.1696$ , genetic fixation  $F_{ST} = 0.0687$ ) and higher genetic variability in the lowland stand ( $P = 91,58\%$ , observed heterozygosity  $H_0 = 0.364$ , expected heterozygosity  $H_E = 0.330$ , diversity of alleles  $v_a = 1.58$ ) in comparison to the oak stand in the Volga uplands ( $P = 77,89\%$ ,  $H_0 = 0.327$ ,  $H_E = 0.272$ ,  $v_a = 1.47$ ). We concluded that these oak forests should be subdivided into different seed zones. Continuing the research by using the set of SNP loci and expanding the set of studied populations will supply Russian forestry by genetic information to optimize the forest seed zoning of the pedunculate oak.

**Keywords:** population, *Quercus robur*, seed zones, single nucleotide polymorphism

Поступила в редакцию: 15.09.2020

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-4-604-608

### ВВЕДЕНИЕ

Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) является одним из наиболее важных видов лесных древесных растений благодаря широкому распространению и своей экономической и экологической роли. Леса с преобладанием этого вида занимают около 3,5 млн га в российской части ареала. Эта территория представляется обширной, но в предыдущие геологические периоды естественные дубравы занимали более 25 миллионов гектаров.

Палеографические исследования показали, что северная граница вида сместилась к югу на 300-700 км в связи с изменением климата в позднем голоцене [Нейштадт, 1957]. В прошедшем тысячелетии сокращение дубрав усилилось благодаря антропогенным факторам [Кожаринов и Борисов, 2012]. Экстремально холодные зимы, вспышки численности насекомых и болезни вызвали дальнейшую деградацию насаждений в XX веке. Эти причины привели к сокращению площади дуба черешчатого в России еще на 23% только за последние 50 лет [Царалунга, 2015]. Однако неуверенность о перспективах вида может быть преждевременными. Во многих частях ареала все еще сохраняются популяции с ценным генофондом и значительной внутривидовой изменчивостью. Они могут стать важным источником получения семенного материала - основные стратегии восстановления этого вида связаны с искусственным лесоразведением и лесовосстановлением [Шутяев, 2000]. В связи с этим все большее значение приобретает необходимость верификации существующих систем национальных лесосеменных зон с использованием современных методов [McKenney et al., 2009]. Идентификация популяций и их групп с использованием современных мощных генетических маркеров [Blanc-Jolivet et al., 2018] может стать первым шагом на этом пути. Нами разработан относительно большой набор локусов SNP [Blanc-Jolivet et al., 2020] с использованием технологии секвенирования ДНК нового поколения. Целью настоящего исследования явилась проверка разрешающей способности этих маркеров выявлять внутрирегиональную популяционно-генетическую гетерогенность вида.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Район исследований расположен в лесостепной Самарской области. Здесь имеется относительно большое число небольших участков широколиственных лесов с участием или доминированием дуба черешчатого. Исследованное нами насаждение, обозначенное как Самара\_2 (географические координаты 54°12'57" N, 50°34'56' E), расположено на равнине между Приволжской возвышенностью и Бугульминско-Белебеевской возвышенностью. Другое насаждение («Тольятти», 53°30'53' N, 49°53'40') представляет нагорные дубравы правого берега Волги.

Технология секвенирования ДНК нового поколения ddRAD или Double Digest Restriction Site Associated DNA [Peterson et al., 2012] использована для разработки нового набора SNP-маркеров. Ядерная ДНК 95 особей *Q. robur* и и дуба скального *Q. petraea* Liebl. из 9 стран (Австрия, Беларусь, Бельгия, Венгрия, Великобритания, Германия, Дания, Польша, Словакия, Турция, Украина и Россия) была секвенирована по нашему заказу в компании Floragenex (Портленд, США). Выявленные 26074 локуса SNP были оптимизированы [Blanc-Jolivet et al., 2020], в результате чего получен набор из 94 наиболее информативных локусов с "географическим сигналом". ДНК для лабораторных анализов выделяли из камбия 10 взрослых деревьев каждого древостоя в соответствии с модифицированным протоколом [Dumolin et al., 1995]. Генотипирование проводили на платформе MassARRAY*i*PLEX™ (Agena Bioscience™) с использованием технологии ipLex™ GOLD chemistry. Спектры были интерпретированы с помощью программного обеспечения Typer Viewer V. 4. 0. 24.71 (Agena Bioscience™).

Результаты были обработаны с помощью программ PAST [Hammer et al., 2001] и GDA\_NT [Degen, неопубл.]. Рассчитаны доля полиморфных локусов (P), аллельное разнообразие  $v_a$  [Gregorius, 1987], наблюдаемая гетерозиготность  $H_o$ , ожидаемая гетерозиготность  $H_e$  (Hartl, Clark, 1997), параметр F-статистики Райта  $F_{ST}$  [Weir, Cockerham,

1984], меры дифференциации популяции  $\Delta_T$ , генетическое расстояние  $d_0$  [Gregorius, 1984; Gregorius, 1987], межвыборочная компонента генетической изменчивости  $F_{ST}$ . Визуализация генетических различий популяций обеспечивалась построением дендрограммы на основе матрицы генетических расстояний  $d_0$  с использованием программы PAST и метода кластеризации UPGMA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть локусов (4 из 95 или 4,21%) были мономорфными в обеих популяциях, хотя мы обнаружили в них полиморфизм при анализе других популяций (Blanc-Jolivet et al., 2020). Четыре и семнадцать других локусов были мономорфны в выборках Самара\_2 и Тольятти соответственно. Другие показатели подтвердили тенденцию к более высокому полиморфизму первой популяции (таблица). Значения  $v_a$  были выше в 56 (61,5%) полиморфных локусах в насаждении Самара\_2 по сравнению с 26 (28,6%) полиморфных локусов в выборке Тольятти. Аналогичный вывод был сделан при сравнении наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Средние значения этих параметров представлены в таблице. Они были выше в выборке Samara\_2 на 19,2 % (P), 11,3 % ( $H_O$ ), 21,3 % ( $H_E$ ) и 7,5 % ( $v_a$ ) по сравнению данными по насаждению Тольятти. Эти различия статистически значимы.

**Таблица. Показатели генетического разнообразия популяций *Q. robur*.**

Выборки	Параметры				
	P	$H_O$	$H_E$	$v_a$	$F_{ST}$
Samara_2	91.58	0.364	0.330	1.58	- 0.084
Tolyatti	77.89	0.327	0.272	1.47	- 0.166

Кластерный анализ с использованием матрицы генетических расстояний  $d_0$  между деревьями двух насаждений обнаружил относительно высокую разрешающую способность разработанного набора локусов SNP для отнесения каждой особи к той или иной популяции. Все особи выборок Самара\_2 и Tolyatti были разделены в дендрограмме на две отдельные группы кластеров, соответствующие этим двум популяциям. Между популяциями наблюдались статистически значимые уровни генетической дифференциации и коэффициента инбридинга ( $d_0 = 0,170$ ,  $\Delta_T = 0,1696$ ,  $F_{ST} = 0,0687$ ).

Самарская область была выбрана нами в качестве региона исследований из-за того, что на ее территории есть большая вероятность выявления «мозаичности» генетической структуры популяций. По палеоботаническим и геоботаническим данным [Нейштадт, 1957; Горчаковский, 1968], вид существовал здесь с верхнего плейстоцена, древнего и раннего голоцена. Лесная полоса и речная сеть между реками Волга и Урал служили «мостом» для генного потока между популяциями всего Поволжья, Предуралья и Общего Сырта [Семериков, 1986]. На этот "котел" могли также оказывать влияние популяционные волны из голоценовых убежищ дуба черешчатого, расположенных к западу от Поволжья [Кожаринов, Борисов, 2012]. Кроме того, анализ морфологических признаков выявил существование двух экологических групп пойменных и нагорных дубрав [Семериков, 1986]. Различия могут иметь генетическую основу. Проведение исследования насаждений из байрачных и пойменных дубрав юга России с использованием 5 праймеров ISSR показали [Chokheli et al., 2018], что их генетические различия были статистически значимыми. Деревья из байраков имели более низкую гетерозиготность. Наш результат о меньшем генетическом

разнообразии выборки Тольятти из аналогичных экологических условий подтверждает эту закономерность.

Обе выявленные основные закономерности (существенная пространственная генетическая гетерогенность популяций дуба черешчатого в Поволжье, сравнительно большие различия уровней их генетической изменчивости) важны для оптимизации семенного районирования дуба черешчатого. Действующее районирование вида насчитывает 7 зон. Обширная лесосеменная зона 2 включает полностью или частично 22 лесостепных региона России от Южного Урала до границы с Белоруссией, включая значительную часть Самарской области. Обе изученные популяции расположены в этой семенной зоне. Возможно, дубраву из района г. Тольятти, генетически отличающуюся от насаждения Самара\_2, следует отнести к лесосеменной зоне 6, которая охватывает преимущественно степные дубравы южной части Самарской области и соседних Оренбургской и Саратовской областей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из результатов исследования можно сделать два заключения: общее и частное.

1) Разработанный нами новый набор локусов SNP является информативным и эффективным инструментом для выявления генетических различий региональных популяций черешчатого дуба. Вследствие этого эти маркеры могут быть использованы для оптимизации лесосеменного районирования этого вида в России, в том числе для определения границ районов.

2) Разделение дубрав Самарской области на различные лесосеменные зоны является обоснованным, так как они включают генетически гетерогенные популяции. Но насаждения Самара\_2 и Тольятти вряд ли можно отнести как к одной и той лесосеменной зоне. Возможно, границу лесосеменной зоны следует передвинуть севернее, включив в его состав дубравы в районе г. Тольятти. Продолжение исследований и расширение сети изучаемых популяций позволит ответить на этот вопрос более определенно.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проведено за счет гранта Российского научного фонда № 19-16-00084.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семериков Л.Ф. Популяционная структура древесных растений (на примере дуба Европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.
2. Горчаковский П.Л. Растения европейских широколиственных лесов на восточном пределе их ареала // Тр. ин-та экологии растений и животных. Вып. 59. Свердловск, 1968. 208 с.
3. Кожаринов А.В., Борисов П.В. Распространение дубовых лесов на территории Восточной Европы за последние 13 тысяч лет // Лесоведение. 2012. № 5. С. 22-28.
4. Лесосеменное районирование основных лесобразующих пород в СССР. М.: Лесн. пром-сть 1982. 365 с.
5. Нейштадт М.И. История лесов и палеогеография СССР в голоцене. М.: Изд-во АН СССР. 1957. 403 с.
6. Сбоева Я.В., Васильева Ю.С., Чертов Н.В. и др. Молекулярно-генетическая идентификация популяций сосны обыкновенной и лиственницы Сукачева в Пермском

- крае на основании полиморфизма ISSR- маркеров // Сибирский лесной журнал. 2020. № 4. С. 35–44.
7. Царалунга В.В., Фурменкова Е.С., Крюкова А.А. Внешние признаки патологии дуба черешчатого. Воронеж: ФГБОУ ВО «ВГЛТУ», 2015. 231 с.
  8. Чохели В.А., Каган Д.И., Вардуни Т.В. и др. Эколого-генетическая дифференциация ценопопуляций *Quercus robur* L. на территории Ростовской области с применением ISSR-маркеров // Turczaninowia. 2018. Т. 21. № 4. С. 161–167. DOI: [10.14258/turczaninowia.21.4.16](https://doi.org/10.14258/turczaninowia.21.4.16)
  9. Шутяев А.М. Биоразнообразие дуба черешчатого и его использование в селекции и лесоразведении. Воронеж: НИИЛГиС, 2000. 335 с.
  10. Blanc-Jolivet C., Yanbaev Y., Kersten B. et al. A set of SNP markers for timber tracking of *Larix* spp. in Europe and Russia // Forestry. 2018. V. 91 (5). P. 614–628. DOI: [10.1093/forestry/cpy020](https://doi.org/10.1093/forestry/cpy020)
  11. Blanc-Jolivet C., Bakhtina, S., Yanbaev, R. et al. Development of new SNPs loci on *Quercus robur* and *Quercus petraea* for genetic studies covering the whole species' distribution range // Conservation Genetics Resources. 2020. V. 12. P. 597–600. DOI: [10.1007/s12686-020-01141-z](https://doi.org/10.1007/s12686-020-01141-z)
  12. Dumolin S., Demesure B., Petit R.J. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method // Theoretical and Applied Genetics. 1995. V. 91. P. 1253–1256. DOI: [10.1007/BF00220937](https://doi.org/10.1007/BF00220937)
  13. Gregorius, H.-R. A unique genetic distance // Biometrical Journal. 1984. V. 26 (1). P. 13–18. DOI: [10.1002/bimj.4710260103](https://doi.org/10.1002/bimj.4710260103)
  14. Gregorius, H.-R. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation // Theoretical and Applied Genetics. 1987. V. 74 (3). P. 397–401. DOI: [10.1007/bf00274724](https://doi.org/10.1007/bf00274724)
  15. Hammer Ø., Harper D., Ryan P. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // Palaeontologia Electronica, V. 4, (1). Article 4.
  16. Hart D.L., Clark A.G. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland MA. 1997.
  17. Jakobsson M., Rosenberg N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure // Bioinformatics. 2007. V. 23 (14). P. 1801–1806. DOI: [10.1093/bioinformatics/btm233](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233)
  18. McKenney D., Pedlar J., O'Neill G. 2009. Climate change and forest seed zones: Past trends, future prospects and challenges to ponder // The Forestry Chronicle. V. 85 (2). P. 258–266. DOI: [10.5558/tfc85258-2](https://doi.org/10.5558/tfc85258-2)
  19. Peterson B.K., Weber J.N., Kay E.H. et al. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species // Plos One. 2012. V. 7 (5). e37135. DOI: [10.1371/journal.pone.0037135](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135)
  20. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155 (2). P. 945–959.
  21. Weir, B.S., Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population-structure // Evolution. 1984. V. 38 (6). P. 1358–1370. DOI: [10.2307/2408641](https://doi.org/10.2307/2408641)