УДК 575.17:582.632.2

Р.Ю. Янбаев, Б. Деген, Ю.А. Янбаев, А.А. Габитова, Н.Н. Редькина

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ: ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ РЕШЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ВОПРОСОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДУБРАВ НА ЮЖНОМ УРАЛЕ**Ключевые слова:** дуб черешчатый; полиморфизм, микросателлитные локусы; восстановление дубрав.

Введение. Известно (El Mousadik, Petit, 2014), что снижение внутривидовой изменчивости, основы действия естественного отбора, уменьшает адаптивный потенциал растений. Следовательно, выявление популяций, отличающихся повышенным уровнем генетического разнообразия, может быть полезным для отбора среди них объектов сохранения генофонда [1, 2], их использования в качестве генетико-селекционного объекта, в том числе в лесовосстановительных целях. Эти положения справедливы и в отношении древесных растений [4, 10].

На Южном Урале, по территории которого проходит восточная граница ареала дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), уже несколько десятилетий наблюдается деградация дубовых насаждений из-за неблагоприятных природно-климатических процессов, вызвавших распространение заболеваний вида и периодическое резкое увеличение численности энтомофитов [3]. Поэтому перед лесоводами остро стоят вопросы о будущем дуба в регионе, о перспективах его естественного и искусственного воспроизводства. При этом необходимы сведения о качестве естественного возобновления породы, особенно в дубравах и широколиственных лесах с участием данного вида, фрагментированных в результате хозяйственного освоения. Для этого востребованы не только стандартная лесоводственная информация (численность и благонадежность подроста, его возрастная структура и др.), но и знания о генетическом качестве нового поколения дубрав.

Цель и задачи исследования – оценить возможность применения анализа микросателлитных локусов для решения практических вопросов восстановления дубрав на Южном Урале; для этого провести оценку уровня полиморфизма этих молекулярно-биологических маркеров и выявить диапазон различий насаждений дуба по аллельному разнообразию и гетерозиготности.

Материалы и методы. Для выполнения поставленной цели на территории Кувандыкского лесничества Оренбургской области, ООПТ «Дубовая гора» Куединского района и Сарашевского лесничества Пермского края, а также Архангельского, Бурзянского, Дмитриевского и Зилаирского лесничеств Республики Башкортостан заложены 7 пробных площадей. Выбор их расположения продиктован необходимостью наибольшего охвата исследуемой части ареала дуба черешчатого на Южном Урале (расстояние между крайними северной и южной точками около 500 км) и всех растительных зон Башкортостана, а также прилегающих регионов России, где произрастает дуб [3]. Участки для отбора образцов для лабораторного анализа выбирались преимущественно в наиболее характерных для лесничества по бонитету и типам леса приспевающих и спелых, при возможности – в чистых, насаждениях дуба. На каждой пробной площади маркировались по 32 дерева. Величина пробных площадей задавалась так, чтобы на показатели полиморфизма не оказывала влияние семейная кластеризация из-за гравитационного механизма распространения желудей дуба. Как правило, расстояние между двумя соседними деревьями было не менее 50 м, а сами они располагались на условных параллельных трансектах.

Лабораторные эксперименты проведены в Институте лесной генетики фон Тюнена Германии (Schleswig-Holstein, Grosshansdorf) под руководством д-ра Ютты Бушбом, а также в лаборатории биоразнообразия ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет». Экстракция ДНК осуществлялась из зрелых листьев, следуя одному из наиболее популярных в Западной Европе и рекомендованных для видов дуба протоколу [6]. Ее содержание доводилось затем до 10 ng/μl для каждого образца. Для генотипирования особей применялись

два набора мультиплицированных праймеров [9]. Первый из них составляли праймеры микросателлитных локусов QrZAG112, QrZAG96, QpZAG110 и QrZAG11, а второй – QrZAG87, QrZAG7, QrZAG20, QrZAG5b и QrZAG65. Флуоресцентные метки этих праймеров ставились по [6], но при этом рекомендованный краситель NED заменялся на краситель ТЕТ. Полимеразная цепная реакция проводилась в конечном счете для раствора объемом 15 μ l, содержащим 3 μ l экстракта ДНК. Амплифицированные фрагменты очищались с использованием 4 М раствора LiCl. Для разделения и определения амплифицированных продуктов 2 μ l продукта ПЦР смешивались с 8 μ l загрузочного буфера, содержащего 0,25 μ l стандарта размера 550 (GE Healthcare) и загружались в секвенатор MegaBACE 500 (GE Healthcare). Для анализа фрагментов использовался Fragment Profiler 1.2 (GE Healthcare), пики и генотипы верифицировались также визуально.

Для описания уровня полиморфизма выборок использовались такие параметры, как число аллелей на locus A, наблюдаемое число гетерозигот H_o , ожидаемая (H_E) гетерозиготность ($H_E = 1 - \sum_i p_i^2$, где p – частота i -го аллеля в локусе). Для характеристики разнообразия аллелей в той или иной выборке нами также использовался параметр $\bar{r}_{(n)}$ («Обогащенность аллелями» или «Аллельное богатство», англоязычный аналог «Allelic richness») [8]. Его применение оправдано в случаях разной численности используемых выборок, что бывает, когда некоторые генотипы по отдельным локусам не удается надежно идентифицировать и эти данные в дальнейший анализ не включаются. В основе расчетов лежит приведение объемов выборок разного объема к одинаковой стандартизированной численности особей. Вычисляется $\bar{r}_{(n)}$ следующим образом. Аллельное богатство для фиксированной выборки обозначается как число аллелей $r_{(n)}$ обнаруженных (n – число генов). Скорректированное аллельное богатство в локусе тогда определяется как $r'_{(n)} = r_{(n)} - 1$, так как разнообразие должно быть равно нулю, когда в выборке имеется единственный фиксированный аллель. Если в этом локусе анализируются $N > n$ генов, ожидаемое число различных аллелей в выборке n генов может быть получено по методу разрежения [8] по формуле:

$$\bar{r}_{(n)} = E[r_{(n)}] = \sum_i [1 - (\frac{n}{N-N_i}) / (\frac{n}{N})].$$

Здесь N_i представляет встречаемость i -го аллельного гена. Вычисления проводились с применением программ ARLEQUIN 3.11 [7], BOTTLENECK [5] и GDA_NT (автор Б. Деген).

Результаты исследования. Используемые микросателлитные локусы показали высокий полиморфизм южно-уральского дуба черешчатого: QpZAG112 – 27 аллелей в генеральной совокупности исследованных особей, QrZAG96 – 13, QpZAG110 – 17, QrZAG11 – 31, QrZAG87 – 24, QrZAG7 – 20, QrZAG20 – 16, QrZAG5b – 39 и QrZAG65 – 31. Всего в 9 локусах выявлены 218 аллелей (в среднем

$24,2 \pm 2,8$, изменения по локусам в пределах 13–39, коэффициент вариации 35,2 %). Это большое число маркеров предоставляет широкие возможности для обоснованного сравнения отобранных насаждений дуба черешчатого по уровню полиморфизма.

Сведения о диапазоне полиморфизма исследованных микросателлитных локусов в выборках приведены в таблице. В среднем на locus обнаружены $10,7 \pm 1,1$ аллелей с изменениями в пределах 5,1–16,0 (коэффициент вариации 32,4 %). Аллельное богатство в среднем $5,9 \pm 0,5$, но изменяется по локусам в меньших пределах (3,2–8,0, 24,9 %). Эти два показателя тесно связаны – коэффициент корреляции составил статистически достоверное значение 0,940. Связанными на достоверном уровне с коэффициентом 0,765 оказались межлокусная изменчивость коэффициентов вариации числа аллелей на locus и аллельное богатство. В среднем на locus обнаружены 82,7 % гетерозигот ($H_E = 0,827 \pm 0,046$), параметр изменяется по выборкам от 0,518 до 0,941 с коэффициентом вариации 16,7 %. С наблюдаемой гетерозиготностью статистически достоверно связано лишь аллельное богатство (коэффициент корреляции 0,692), а связь показателей H_E и A (коэффициент корреляции 0,537) не достигла общепринятого порогового уровня значимости 95 %.

Выявленные в результате исследования различия по аллельному разнообразию и гетерозиготности выборок показывают возможность выявления и выделения отдельных дубрав как генетико-селекционных объектов – в первую очередь постоянных лесосеменных баз. В этих целях информативным является применение использованного в данной работе набора микросателлитных локусов. Они показали пригодность для решения двух основных задач в области рационального использования лесных ресурсов, решаемых с использованием молекулярно-биологических маркеров: выявления и мониторинга внутривидовой изменчивости лесных древесных пород [10]. На основе полученных нами результатов можно рекомендовать использовать в первую очередь примененные параметры для характеристики полиморфизма дуба черешчатого. Они позволили выявить имеющиеся различия дубовых насаждений. Аллельное разнообразие крайне чувствительно к неблагоприятным, как в случае дуба черешчатого на Южном Урале, процессам, ухудшающим состояние насаждений – уменьшающим численность особей в древостоях и размеры насаждений из-за фрагментации лесов. В научной литературе показано, что выборка из 100 особей представляет 99,5 % средней гетерозиготности генеральной совокупности, но лишь 42–53 % – ее аллельного разнообразия. А применение наблюдаемой гетерозиготности, менее чувствительной к сокращению численности особей, дает свое преимущество из-за существования ее связи с адаптивными возможностями организмов.

Показано [11], что менее гетерозиготные особи обладают пониженной приспособляемостью к факторам окружающей среды.

Таблица Статистическая оценка полиморфизма микросателлитных локусов

Локус	X	Lim	C, %
Число аллелей			
QpZAG112	13,1 ± 1,1	10–17	22,1
QrZAG96	5,1 ± 0,6	3–8	30,6
QpZAG110	7,3 ± 0,4	6–9	15,3
QrZAG11	13,9 ± 1,3	10–19	25,5
QrZAG87	9,9 ± 0,9	6–13	23,7
QrZAG7	9,6 ± 1,2	6–14	33,5
QrZAG20	8,7 ± 0,9	5–12	27,9
QrZAG5b	16,0 ± 2,3	9–26	36,9
QrZAG65	12,4 ± 0,9	8–15	20,2
Аллельное богатство			
QpZAG112	7,0 ± 0,2	6,4–7,6	6,3
QrZAG96	3,2 ± 0,2	2,4–3,9	16,2
QpZAG110	4,7 ± 0,2	4,1–5,4	9,1
QrZAG11	7,4 ± 0,3	6,1–8,4	10,2
QrZAG87	6,0 ± 0,3	4,5–6,8	12,7
QrZAG7	5,2 ± 0,3	4,2–6,1	12,9
QrZAG20	5,8 ± 0,3	4,5–6,7	13,2
QrZAG5b	8,0 ± 0,5	6,5–9,8	14,9
QrZAG65	5,6 ± 0,2	5,0–6,2	7,8
Наблюдаемая гетерозиготность			
QpZAG112	0,911 ± 0,034	0,758–1,000	9,3
QrZAG96	0,518 ± 0,047	0,417–0,786	24,2
QpZAG110	0,735 ± 0,037	0,615–0,900	13,2
QrZAG11	0,941 ± 0,019	0,871–1,000	5,5
QrZAG87	0,923 ± 0,025	0,833–1,000	7,0
QrZAG7	0,917 ± 0,036	0,750–1,000	10,2
QrZAG20	0,919 ± 0,028	0,769–1,000	8,0
QrZAG5b	0,808 ± 0,042	0,615–0,923	13,8
QrZAG65	0,773 ± 0,043	0,571–0,889	14,7

Примечание: X – среднее значение признака и его ошибка, Lim – пределы изменения значений, C – коэффициент вариации.

Выводы. Изучение выборок дуба черешчатого Южного Урала показало существование значительной изменчивости по показателям «число аллелей на локус», «аллельное богатство» и «наблюдаемая гетерозиготность». Этот результат доказывает важность выявления дубрав, обладающих сравнительно высоким полиморфизмом микросателлитных локусов и необходимость для оформления их в качестве

объектов генетико-селекционного комплекса. Использование семенного материала, собранного в этих насаждениях, позволит воспроизводить в лесных культурах уровень внутривидовой изменчивости, существующий в материнских насаждениях, и обеспечить таким образом потенциал для адаптации к лесорастительным условиям.

Библиографический список

1. Боронникова, С.В. Популяционно-генетический мониторинг генофондов редких ресурсных видов растений Пермского края [Текст] / С.В. Боронникова, под ред. Е.И. Демьяновой, С.А. Овеснова, Л.Г. Переведенцевой // Флора Урала в пределах бывшей Пермской губернии и ее охрана: материалы межрегиональной конф., посвященной 140-летию со дня рождения П.В. Сюзева. Пермь, 2007. С. 37–43.
2. Боронникова, С.В. Характеристика генофондов редкого лекарственного вида *Adonis vernalis* L. с использованием ISSR-маркеров [Текст] / С.В. Боронникова, Н.Н. Тихомирова, О.А. Кравченко // Аграрный вестник Урала. 2009. № 5 (59). С. 67–70.
3. Попов, Г.В. Леса Башкирии [Текст] / Г.В. Попов. Уфа: Башк. кн. изд-во, 1980. 144 с.
4. Султанова, Р.Р. Формирование нектарных насаждений липы мелколистной [Текст] / Р.Р. Султанова, С.И. Конашова, Н.В. Михайлова // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 2. С. 32–33.
5. Cornuet, J.M. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data [Text] / J.M. Cornuet, G. Luikart // Genetics. 1996. V. 144. P. 2001–2014.
6. Dumolin, S. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in penduculate oak investigated with an efficient PCR method [Text] / S. Dumolin,

B. Demesure, R. Petit // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 1253–1256.

7. Excoffier, L. Arlequin ver.3.0: an integrated software package for population genetics data analysis [Text] / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // Evol. Bioinform. Online. 2005. V. 1. P. 47–50.

8. Greenbaum, G. Allelic richness following population founding events – a stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift [Text] / G. Greenbaum, Y. Zarmi, S. Bar-David // PLoS ONE. 2014. V. 9 (12): e115203.

9. Lepais, R. High throughput microsatellite genotyping in oak species [Text] / R. Lepais, V. Leger, S. Gerber // Silvae Genet. 2006. V. 55. P. 238–240.

10. Nowakowska, J.A. Microsatellite markers in analysis of forest tree populations [Text] / J.A. Nowakowska // Microsatellite markers (I.Y. Abdurakhmonov, ed.). Tech, 2016. DOI: 10.5772/64867.

11. Reed, D.H. Correlation between fitness and genetic diversity [Text] / D.H. Reed, R. Frankham // Conserv. Biol. 2003. V. 17. P. 230–237.

Сведения об авторах

1. **Янбаев Руслан Юлаевич**, аспирант кафедры лесоводства и ландшафтного дизайна ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34. E-mail: qwer222@mail.ru.

2. **Деген Бернд**, доктор наук, профессор, директор Института лесной генетики Института фон Тюнена (Германия), Германия, г. Гросгансдорф, Сикер Ландштрассе-2. Тел.: +494102696101, e-mail: Bernd.degen@thuenen.de.

3. **Янбаев Юлай Аглямич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой безопасности жизнедеятельности и охраны окружающей среды ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, ул. 3. Валиди, 32. E-mail: Yanbaev_ua@mail.ru.

4. **Габитова Айгуль Айдаровна**, заведующая лабораторией биоразнообразия ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34. E-mail: abigabi@yandex.ru.

5. **Редькина Нина Николаевна**, доктор биологических наук, профессор кафедры безопасности жизнедеятельности и охраны окружающей среды ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, ул. 3. Валиди, 32. E-mail: Redkinina@mail.ru.

Приведены результаты изучения полиморфизма дуба черешчатого Южного Урала. В качестве молекулярно-биологических маркеров использованы девять микросателлитных локусов. Обнаружено существование значительной изменчивости насаждений по аллельному разнообразию и наблюдаемой

гетерозиготности. Показана важность выявления дубрав, обладающих сравнительно высоким полиморфизмом, для их оформления в качестве объектов генетико-селекционного комплекса и использования для повышения эффективности лесокультурных работ.

R. Yanbaev, B. Degen, Y. Yanbaev, A. Gabitova, N. Redkina

MICROSATELLITE LOCI: AN EFFECTIVE TOOL FOR PERFORMING PRACTICAL PROBLEMS IN RESTORATION OF OAK FORESTS IN THE SOUTHERN URALS

Keywords: *pedunculate oak; polymorphism; microsatellite loci; restoration of oak forests.*

Authors' personal details

1. **Yanbaev Ruslan**, Post-graduate, Chair of forestry and landscape design, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University», Ufa, 50-letiya Otyabrya str., 34. E-mail: qwer222@mail.ru.

2. **Degen Bernd**, Dr, professor, director of the Thuenen institute of forest genetics, Germany, Grosshansdorf, Sieker Landstrasse-2. Phone: +494102696101, e-mail: Bernd.degen@thuenen.de.

3. **Yanbaev Yulay**, Doctor of biological sciences, professor, head of chair of life safety and protection of environment, Bashkir State University. Ufa, 50-letiya Otyabrya str., 34. E-mail: Yanbaev_ua@mail.ru.

4. **Gabitova Aygul**, head of Laboratory of Biodiversity, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Agrarian University». Ufa, 50-letiya Otyabrya str., 34. E-mail: abigabi@yandex.ru.

5. **Redkina Nina**, Doctor of biological sciences, professor, chair of life safety and protection of environment, Bashkir State University, Ufa, Z. Validi str., 32. E-mail: Redkinina@mail.ru.

Results of an investigation of polymorphism in the pedunculate oak of the Southern Urals are presented. Nine microsatellite loci used as molecular markers. Considerable variability of stands in allelic diversity and observed heterozygosity was found. The need to identi-

fy oak stands with relatively high polymorphisms are shown. Such stands are recommended to include into genetic-breeding complexes to increase the efficiency of artificial forests.

© Янбаев Р.Ю., Деген Б., Янбаев Ю.А., Габитова А.А., Редькина Н.Н.