ISSN 2542-1468, Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2021. Т. 25. № 4. С. 44–51. © МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2021

УДК 575.17: 582.632.2 DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR*) С ПОМОЩЬЮ SSR-АНАЛИЗА

Е.Е. Кулаков, Е.А. Воробьева, В.А. Сиволапов, Н.А. Карпеченко

ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области», 394000, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105

evgenyykulakov@yandex.ru

Приведены результаты молекулярно-генетических исследований популяций дуба черешчатого из 11 регионов России. С использованием 10 микросателлитных праймеров было выявлено 1049 аллелей. Изученные выборки несущественно отличаются по наблюдаемому и эффективному числу аллелей. Для оценки генетической изменчивости популяций рассчитан показатель ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, который указывает на дефицит гетерозиготных генотипов. Установлено, что каждое отдельное дерево в изученных популяциях обнаруживает 87 % дефицит гетерозигот относительно популяции и 85,7 % относительно вида. Отмечено, что среди всех изученных аллелей 81 % составили уникальные, причем они встречаются только в каком-либо одном локусе. На дендрограмме, построенной на основании генетического расстояния наблюдается кластеризация популяций дуба черешчатого в несколько отдельных групп.

Ключевые слова: дуб черешчатый, полиморфизм ДНК, SSR-маркеры, межпопуляционное разнообразие

Ссылка для цитирования: Кулаков Е.Е., Воробьева Е.А., Сиволапов В.А., Карпеченко Н.А. Оценка полиморфизма дуба черешчатого (*Quercus robur*) с помощью SSR-анализа // Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2021. Т. 25. № 4. С. 44–51. DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51

Оценка биологического разнообразия лесных фитоценозов с помощью SSR-анализа имеет первостепенное значение для изучения и сохранения растительных ресурсов. В настоящее время важнейшими путями сохранения генофонда основных лесообразующих пород и выявления наиболее продуктивных и устойчивых популяций для воспроизводства видов являются оценка популяционной структуры и характер генетической изменчивости. В связи с этим актуальность приобретает анализ генетической структуры популяций дуба черешчатого с использованием SSR-маркеров для оценки популяционно-генетических параметров [1–4].

В настоящее время исследование количественных характеристик основных лесообразующих пород проводится с помощью ДНК-маркеров [5–8].

Для оценки полиморфизма в соответствии с современным уровнем развития науки требуются количественные оценки популяционно-генетических параметров с помощью молекулярно-генетических маркеров. [9]. При выборе типа исследования в первую очередь необходимо обратить внимание на возможность анализа степени генетического разнообразия структурных элементов генома.

Так, SSR-маркеры выявляют полиморфизм участков ДНК, заключенных между тандемно повторяющимися элементами — микросателлитами [10], и приобрели большую популярность для изучения генетического разнообразия ресурсных травянистых [11] и древесных видов растений [12–16] за счет легкого выделения и идентификации элементов генома.

SSR-маркеры позволяют проанализировать бóльшую часть генома изучаемого вида, дать разностороннюю характеристику изучаемых генофондов и выявить их специфические особенности. Поэтому их применение позволяет изучать генофонды ресурсных видов лесообразующих пород, которые занимают обширные ареалы.

Цель работы

Цель работы — изучение генетической изменчивости в популяциях дуба черешчатого, характеризующих широтный долготный и высотный профили ареала вида.

Материалы и методы

Объектом для изучения генетического разнообразия послужили 11 популяций дуба черешчатого (*Quércus róbur)* из различных регионов России. Широкая географическая представленность дуба черешчатого в исследовании позволила выявить зависимость частоты аллелей полиморфных локусов от географического положения (табл. 1).

Оценка степени генетического разнообразия проводилась на базе лаборатории отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов филиала ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области». Образцы для ДН-анализа предоставлялись центрами защиты леса со всей России.

Для оценки генетического разнообразия культур дуба черешчатого нами использован метод SSR-анализа (Simple Sequence Repeats) [17], доказав свою высокую эффективность при изучении на уровне популяций [18–22]. Выделение ДНК проводили с помощью цетилтриметиламмония бромида

Таблица 1

Происхождение анализируемых образцов, отобранных для молекулярно-генетического анализа

Origin of the analyzed samples taken for molecular genetic analysis

Административно-территориальная единица	Лесничество	Участковое лесничество	Квартал	Выдел	Наименование выборки
Республика Адыгея	Майкопское	Курджинское	7	8	Дамк
Брянская обл.	Учебно-опытный лесхоз	–	–	–	Дбу
Волгоградская обл.	Калачеевское	–	–	–	Двк
Курская обл.	Курское	Бесединское	67	1	Дкб (Дккб)
Республика Башкортостан	Кугарчинское	Инянское	37	5	Дки (Дкки)
Самарская обл.	Кинельское	Красносамарское	27	20	Дкк (Дскк)
Республика Мордовия	Ельниковское	–	21	11	Дме
	Краснослободское	Краснослободское	27	20	Дмк (Дмкк)
Оренбургская обл.	Кувандыкское	–	–	–	Док
Пензенская обл.	Юровское	–	–	–	Дпюр (Дпю)
Саратовская обл.	Аткарское	Аткарское	70	10	Дса (Дсаа)

Таблица 2

Характеристика отобранных для работы ядерных микросателлитных локусов для видов дуба

Characteristics of selected for operation nuclear microsatellite loci for oak species

Локус (праймер)	Последовательность	Число аллелей	Размеры ампликона, п. н.
QrZAG11	F: CCTTGAACTCGAAGGTGTCCTT R: GTAGGTCAAAACCATTGGTTGACT	16	242–286
QrZAG39	F: CACCGCTGGAATTTTAAGGGA R: GACCTAAGCCAAAGTGTGGGC	17	103–139
QrZAG96	F: CCCAGTCACATCCACTACTGTCC R: GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	19	137–179
QrZAG112	F: TTCTTGCTTTGGTGCGCG R: GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATT	15	72–106
QrZAG110	F: GGAGGCTTCCTTCAACCTACT R: GATCTCTTGTGTGCTGTATTT	18	193–235
QrZAG5b	F: TGAAGAGTAAGACCATTCACATCA R: GTATGTGAGTGTTTGTGGTTTGG	22	217–263
QrZAG7	F: CAACTTGGTGTTCGGATCAA R: GTGCATTTCTTTTATAGCATTCAC	21	109–152
QrZAG20	F: CCATTAAAAGAAGCAGTATTTTGT R: GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA	17	155–195
QrZAG65	F: CAGTGGTGTCAACTCCTCCCAG R: GTCAGGTGACCATTCAAACCTAGAA	27	249–306
QrZAG87	F: TCCCACCACTTTGGTCTCTCA R: GTTGTCAGCAGTGGGATGGGTA	18	101–141

CTAB-методом [23] из вегетирующих частей, собранных в чистых культурах дуба черешчатого (*Quércus róbur*) (30 образцов в каждой выборке).

Концентрацию ДНК измеряли с помощью прибора для измерения концентрации NanoPhotometer® P-Class P 330**.** Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации маркерных участков проводилась локусами QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG110 в пределах 56–64°C (табл. 2).

Детальный метод амплификации ДНК, электрофорез, окрашивание продуктов амплификации EtBr, анализ электрофореграмм, статистической обработки полученных данных приведены в других публикациях [24–25].

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ образцов дуба черешчатого (*Quércus róbur)* из Майкопского лесничества Республики Адыгея, по 10 локусам показал, что все исследуемые

Таблица 3

Параметры генетической изменчивости популяций *Quércus róbur*

Parameters of *Quércus róbur* populations genetic variability

Наименование выборки	Дамк	Дбу	Двк	Дккб	Дкки	Дскк	Дме	Дмкк	Док	Дпю	Дсаа
Число аллелей на локус	8,60	8,10	7,40	9,60	13,1	9,70	10,1	10,1	10,6	10,4	8,9
Эффективное число аллелей на локус	4,82	4,73	5,02	6,48	8,15	5,29	6,66	6,08	5,75	5,80	5,53
Индекс видового разнообразия Шеннона	1,72	1,71	1,61	1,99	2,09	1,83	1,87	1,87	1,85	1,89	1,75
Количество уникальных аллелей	0,40	0,60	0,20	1,00	1,80	0,50	0,60	1,00	1,50	0,50	0,50
Ожидаемая гетерозиготность	0,74	0,18	0,71	0,14	0,79	0,11	0,09	0,11	0,11	0,09	0,09
Наблюдаемая гетерозиготность	0,08	0,77	0,72	0,72	0,80	0,84	0,79	0,77	0,76	0,79	0,75
Индекс фиксации Райта	0,83	0,77	0,73	0,87	0,89	0,87	0,78	0,82	0,77	0,89	0,87

локусы полиморфные, по выявленным 4–13 аллелям. Наибольшее количество аллелей выявлено у локуса QrZAG39 — 13 аллелей, для QrZAG65, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG11 характерно 10 аллелей, QrZAG112 — 9 аллелей. Менее информативными оказались локусы QrZAG96, QrZAG110, QrZAG5b, QrZAG20, у которых выявлено 7, 5, 4 аллели соответственно. Анализ фрагментов из Кугарчинского лесничества Республики Башкортостан, показал высокую полиморфность локусов. Амплификация в ходе ПЦР позволила выявить наличие 139 локусов. Все выявленные локусы характеризовались числом аллелей от 3 (QrZAG96) до 24 (QrZAG39). Для образцов из Волгоградской обл. Калачеевского лесничества число аллелей изменялось от 1 (QrZAG96) до 11 (QrZAG87, QrZAG11), был выявлен мономорфный локус QrZAG96.

Образцы из Бесединского лесничества Курской обл., Кинельского лесничества Самарской области показали высокий полиморфизм. У локусов QrZAG65, QrZAG5b, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG110 выявлено 10 аллелей, у QrZAG112, QrZAG20, QrZAG1 — 9 аллелей, QrZAG39 — 8 аллелей. Анализ дуба черешчатого (*Quércus róbur*) из государственного казенного учреждения Республики Мордовия (ГКУ РМ) Краснослободского территориального лесничества Ельниковского (Дме) и Краснобродского (Дмкк) участковых лесничеств Республики Мордовия по 10 локусам показал, что локусы QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG110 полиморфны, QrZAG96 — мономорфный, у популяции представленной из Ельниковского лесничества. Анализ образцов из Кувандыкского лесничества Оренбургской обл. позволил выявить в изученных выборках наличие 105 локусов, из Юровского лесничества Пензенской обл. обнаружено 104 амплифицированных фрагментов ДНК длиной от 72 до 276 п. н., из Аткарского лесничества Саратовской обл. выявлено 66 локусов. Параметры генетической изменчивости, рассчитанные по результатам микросателлитного анализа указаны в табл. 3.

Число аллелей, одновременно присутствующих в популяции для Дкки составляет 13,1, локусы Док, Дмк, Дме, Дпю характеризуются 10,3, менее информативными оказались Дккб, Дскк, Дсаа, Дбу, Дамк, Двк.

Средний показатель уровня полиморфности составил 5,846, в связи с чем исследуемые выборки были разделены на две группы: 1) локусы, которые имеют уровень полиморфности ниже среднего уровня — Дамк, Дбу,Двк, Дскк, Док, Дсаа, средний уровень полиморфности которых составил 5,190; 2) локусы, которые имеют уровень полиморфности выше среднего (Дккб, Дки, Дме, Дмкк, Дпю), значение которых составляет 6,634. Минимальным значением характеризуется образцы из Учебно-опытного лесхоза Брянской обл. — 4,731. Максимальный уровень полиморфности выявлен у образцов из Кугарчинского лесничества Республики Башкортостан, (8,15). Поскольку уровень полиморфности в популяции является показателем эффективно действующих в исследуемых популяциях аллелей, он взаимосвязан с числом аллелей каждой популяции.

Для детальной оценки генетической изменчивости популяций нами был рассчитан показатель ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, который показывает уровень аллельного разнообразия.

Оценка по 10 локусам показала, что в среднем для всех исследуемых выборок значения составили 0,708 и 0,287. Сопоставление значений наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности показало, что во всех выборках наблюдается дефицит гетерозиготных генотипов. Из всех аллелей уникальные составили 81 %, причем они встречаются только в каком-либо одном локусе. Что касается минимальных значений уровня гетерозиготности, то недостаток гетерозигот наблюдается у образцов из Майкопского лесничества Республики Адыгея.

Мерой информативности как генетического маркера, по предложению Д. Ботштейна [26], принято считать значение содержания полиморфной информации PIC (Polymorphism Information Content). При PIC < 0,25 локус считается не информативным, если 0,25 > PIC > 0,5, то он относится к информативным, при PIC > 0,50 весьма информативным. Таким образом, PIC выявляет дискриминационную способность маркера, зависит от числа установленных аллелей и распределения их частот, тем самым эквивалентен генетическому разнообразию. Нами был вычислен коэффициент информативной ценности по 10 локусам. Полученные результаты указывают на высокую информативность маркеров — PIC > 0,50.

Оценка межпопуляционного разнообразия проводилась на основе индекса видового разнообразия Шеннона *I*, который позволяет оценить видовое богатство культур дуба черешчатого (*Quércus róbur)*. Одним из преимуществ является его комплексность, видовая плотность и выравненность. Таким образом, появляется возможность дать оценку видового разнообразия каждой популяции в отдельности. Среднее значение индекса разнообразия Шеннона *I* для 11 регионов у биотипов дуба черешчатого по праймерам QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG110 составляет 1,839 нит/особь. Минимальное значение *I* выявлено у образцов дуба из Калачеевского лесничества Волгоградской области (1,617 нит/особь), максимальное — у образцов из Кугарчинского лесничества Республики Башкортостан (2,094 нит/особь). Полученные результаты указывают на высокое видовое разнообразие.

Использование *F*-статистики Райта и *G*-статистики Нея для исследованных культур дуба черешчатого (*Quércus róbur*) из различных регионов России позволило определить значения скрещивания близкородственных форм в пределах одной популяции (инбридинг) особи относительно популяции, инбридинга особи относительно вида, а также доли межпопуляционного разнообразия (G_{ST}). Установлено, что 91 % изменчивости приходится на межпопуляционную. Каждое отдельное дерево в 11 регионах обнаруживает 87 % дефицита гетерозигот относительно популяции и 85,7 % относительно вида (рис. 1).

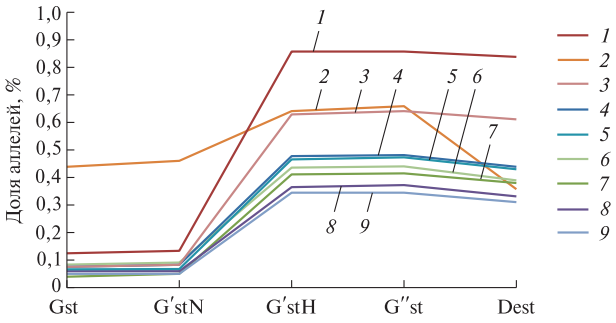

Рис. 1. Показатели *G*-статистики: *1* — QrZAG65; *2* — QrZAG96; *3* — QrZAG1; *4* — QrZAG5b; *5* — QrZAG87; *6* — QrZAG112; *7* — QrZAG20; *8* — QrZAG7; *9* — QrZAG39

Fig. 1. *G*-statistics indicators: *1* — QrZAG65; *2* — QrZAG96; *3* — QrZAG1; *4* — QrZAG5b; *5* — QrZAG87; *6* — QrZAG112; *7* — QrZAG20; *8* — QrZAG7; *9* — QrZAG39

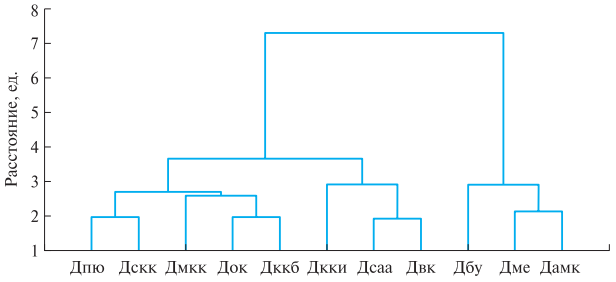

Рис. 2. Дендрограмма сходства популяций *Quércus róbur*
Fig. 2. *Quércus róbur* population similarity dendrogram

Анализ подразделенности генетического разнообразия показал, что дуб черешчатый обладает высоким уровнем популяционного генетического разнообразия, низкой степенью дивергенции в пределах вида в изученной части ареала: 92,7 % всей генетической изменчивости приходилось на внутрипопуляционную, лишь 9,3 % — приходится на межвыборочную составляющую.

Выявленный коэффициент изменчивости *C* характеризуется минимальной вариацией (*C* = 4,4 %): локус QrZAG11 — 7,8 %, QrZAG39 — 4,2, QrZAG96 — 4,3, QrZAG112 — 4,6, QrZAG110 — 7,2, QrZAG5b — 7,6, QrZAG7 — 5,4, QrZAG20 — 8,1, QrZAG65 — 1,2 и QrZAG87 — 6,5.

Для оценки степени генетической дифференциации дуба черешчатого (*Quércus róbur*) из Брянской, Саратовской, Волгоградской, Пензенской, Оренбургской, Курской областей, Республики Мордовии, Республики Адыгеи, Республики Башкортостана было рассчитано генетическое расстояние Нея (*D*) между выборками. Дендрограмма сходства исследуемых популяций построена с помощью программного обеспечения Statistica 10.

На основании генетических расстояний Нея была построена дендрограмма, которая иллюстрирует дифференциацию популяций. Наибольшее генетическое расстояние установлено между образцами из Пензенской обл. и Республики Адыгея (рис. 2).

На дендрограмме, построенной на основании генетического расстояния наблюдается кластеризация исследуемых популяций в несколько отдельных групп. В изученной части популяции дуба черешчатого (*Quércus róbur*) можно четко разделить на три группы. К первой группе относятся популяции из Брянской обл., Республики Мордовия, Республики Адыгея, ко второй — образцы из Республики Башкортостан, Саратовской и Волгоградской областей, к третьей — из Пензенской, Оренбургской, Курской областей. Важно отметить, все исследуемые выборки имеют сложную систему структурированности в пределах района исследования.

Выводы

1. С использованием 10 SSR-праймеров в 11 исследованных выборках было выявлено более 1000 аллелей, среди которых 85 аллелей у образцов из Майкопского лесничества республики Адыгея; 81 аллель Учебно-опытного лесничества Брянской обл.; 74 аллели Калачеевского лесничества Волгоградской обл.; 96 аллелей у образцов из Беседиснкого лесничества Курской обл.; 129 аллелей у образцов из республики Башкортостан; 98 — у образцов из Кинельского лесничества Самарской обл.; 101 аллель выявлена у образцов из Государственного казенного учреждения Республики Мордовия (ГКУ РМ) Краснослободского и Ельниковского лесничеств; 105 аллелей — из выборки Кувандыкского лесничества Оренбургской обл.; 90 аллелей из Юровского лесничества Пензенской обл. и 89 аллелей у образцов из Аткарского лесничества Саратовской обл.

2. Причинами сравнительно высокого полиморфизма и генетического своеобразия дуба черешчатого (*Quércus róbur*), обнаруженного с помощью SSR-анализа, могут быть особенности истории их формирования. Они могут представлять потомство мигрантов, распространившихся из рефугиумов и смешавшихся впоследствии с местными популяциями.

3. Изученные выборки несущественно отличаются по наблюдаемому и эффективному числу аллелей. Наблюдаемое число аллелей варьирует от 4,364 до 11,364. Эффективное число аллелей в исследуемых выборках — от 1,700 до 7,418.

4. Доля полиморфных локусов в исследуемых выборках составляет 98,18 %, индекс Шеннона — от 1,617 до 2,094.

Список литературы

[1] Путенихин В.П. Фенотипическая структура популяций дуба черешчатого в Башкирском Предуралье как основа сохранения генофонда вида в регионе // Известия Самарского научного центра РАН, 2013. Т. 15. № 3 (4). С. 1410–1412.

[2] Габитова А.А. Дуб черешчатый (*Quercus róbur* L.) на Южном Урале: эколого-генетический анализ популяционной структуры: автореф. дис. … канд. биол. наук. Уфа, 2012. 18 с.

[3] Семериков Л.Ф. Популяционная структура дуба черешчатого (*Quercus róbur* L.) // Исследование форм внутривидовой изменчивости растений / под ред. С.А. Мамаева, В.И. Шабурова. М.: Наука, 1981. С. 25–51.

[4] Политов Д.В. Применение молекулярных маркеров в лесном хозяйстве для идентификации, инвентаризации и оценки генетического разнообразия лесных ресурсов // Лесохозяйственная информация, 2008. № 3–4. С. 24–27.

[5] Боронникова С.В. Популяционно-генетический мониторинг генофондов редких ресурсных видов растений Пермского края // Флора Урала в пределах бывшей Пермской губернии и ее охрана: материалы межрегиональной конф., посвященной 140-летию со дня рождения П.В. Сюзева, Пермь, 18–19 декабря 2007 г. Пермь: Изд-во ПГНИУ, 2007. С. 37–43.

[6] Алтухова Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 431 с.

[7] Нечаева Ю.С., Боронникова С.В., Пришнивская Я.В. Молекулярно-генетический анализ некоторых хвойных видов растений в Пермском крае // Евразийский Союз Ученых, 2014. № 5–5. С. 114–116.

[8] Чохели В.А., Козловский Б.Л., Середа М.М., Вардуни Т.В. Результаты изучения фенологиченских форм Quercus robur L. с помощью ISSR-маркеров // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки, 2016. № 2 (190). С. 72–77.

[9] Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь: Изд-во ПГНИУ, 2013. 223 с.

[10] Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994, v. 20, pp. 76–183.

[11] Боронникова С.В. Исследование генетической изменчивости популяций редкого вида Урала Adenophora lilifolia (L.) A.DC. на основании анализа полиморфизма ISSR-маркеров // Генетика, 2009. Т. 45, № 5. С. 652–655.

[12] Светлакова Т.Н. Эколого-генетический анализ популяционной структуры Populus tremula L. в Пермском крае // Экологическая генетика, 2012. Вып. 3. С. 43–47.

[13] Reed D.H. Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity // Conserv. Biol., 2003, v. 17, pp. 230–237.

[14] Lepais O., Leger V., Gerber S. High throughput microsatellite genotyping in oak species // Silvae Genetica, 2006, v. 55, pp. 238–240.

[15] Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phonological varieties of Quércus róbur by ISSR-markers // J. of Botany, 2016, t. 2016, p. 7910451.

[16] Lefort F., Echt C., Streiff R., Vendramin G.G. Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics // Forest Genetics, 1999, no. 6 (1), pp. 15–20.

[17] Янбаев Р.Ю., Габитова А.А., Султанова Р.Р., Боронникова С.В., Янбаев Ю.А. ISSR-анализ полиморфизма ДНК дуба черешчатого: аргументы в пользу использования для лесовосстановления семян местных насаждений // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2017. № 1 (63). С. 220–222.
[18] Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала, 2009. № 2 (56). С. 57–59.
[19] Svetlakova T.N., Boronnikova S.V., Yanbaev Y.A. Genetic diversity and differentiation in Ural populations of the aspen, Populus tremula L., as revealed by inter-simply sequence repeat (ISSR) markers // Silvae Genetica, 2014, no. 1, pp. 39–41.
[20] Kimura M., Crow J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics (US), 1964, v. 49, pp. 725–738.
[21] Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist, 1972, v. 106, pp. 283–292.
[22] Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, v. 76, pp. 5269–5273.
[23] Программа и методика по пункту 59. План мероприятий (дорожной карты) «Развитие биотехнологии и генной инженерии». Пушкино: Изд-во ФБУ «Рослесозащита», 2014. 205 с.
[24] Кулаков Е.Е., Сиволапов В.А., Воробьева Е.А., Сиволапов А.И. Генетическая изменчивость лиственницы Сукачева (Larix sukaczewii Djil.) в географических культурах под Воронежем // Лесотехнический журнал, 2018. № 1 (29). С. 35–42.
[25] Воробьева Е.А., Кулаков Е.Е., Сиволапов В.А. Особенности генетического разнообразия нормальных и улучшенных семян рода Pinus // Экологические и биологические основы повышения продуктивности и устойчивости природных и искусственно возобновленных лесных экосистем: Материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию высшего лесного образования в г. Воронеж и Центрально-Черноземном регионе России, Воронеж, 04–06 октября 2018 г. Воронеж: Издат-во ВГЛТУ, 2018. Т. 1. С. 498–504.
[26] Botstein D., White R.L., Skalnick M.H., Davies R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am J. Hum. Genet., 1980, 32, pp. 314–331.

Сведения об авторах

Кулаков Евгений Евгеньевич — заместитель начальника отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов филиала ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области», evgenyykulakov@yandex.ru

Воробьева Елена Анатольевна — начальник отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов филиала ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области», vorobyevaea@rcfh.ru

Сиволапов Владимир Алексеевич — директор филиала ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области», кандидат сельскохозяйственных наук, sivalapovva@rcfh.ru

Карпеченко Никита Александрович — канд. биол. наук, инженер отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов филиала ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области», nikitakarpechenko@mail.ru

Поступила в редакцию 05.02.2021.
Принята к публикации 01.03.2021.

PETIOLATE OAK (*QUERCUS ROBUR*) POLYMORPHISM EVALUATION BY SSR-ANALYZING

E.E. Kulakov, E.A. Vorobyeva, V.A. Sivolapov, N.A. Karpechenko

FBU «Roslesozaschita» — «CFP of Voronezh region», 105, Lomonosov st., 394000, Voronezh, Russia

evgenyykulakov@yandex.ru

The results of molecular-genetic studies of populations of oak petiolate from 11 regions of Russia are presented. Using 10 microsatellite primers, 1049 alleles were identified. The studied samples differ insignificantly in the observed and effective number of alleles. To assess the genetic variability of populations, an indicator of expected and observed heterozygosity was calculated, which indicates a deficiency of heterozygous genotypes. It was found that each individual tree in the studied populations shows 87 % deficiency of heterozygotes relative to the population and 85,7 % relative to the species. It was noted that among all the studied alleles, 81 % were unique, and they occur only in one locus. The dendrogram based on the genetic distance shows clustering of the populations of the oak petiolate into several separate groups.
Keywords: Quercus robur, DNA polymorphism, SSR-markers, interpopulation diversity

Suggested citation: Kulakov E.E., Vorobyeva E.A., Sivolapov V.A., Karpechenko N.A. *Otsenka polimorfizma duba chereshchatogo (Quercus robur) s pomoshch'yu SSR-analiza* [Petiolate Oak (*Quercus robur*) polymorphism evaluation by SSR-analyzing]. Lesnoy vestnik / Forestry Bulletin, 2021, vol. 25, no. 4, pp. 44–51.
DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51

References

[1] Putenikhin V.P. *Fenotipicheskaya struktura populyatsiy duba chereshchatogo v Bashkirskom Predural'e kak osnova sokhraneniya genofonda vida v regione* [Phenotypic structure of oak populations in the Bashkir Urals as a basis for preserving the gene pool of the species in the region]. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN [Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2013, v. 15, no. 3 (4), pp. 1410–1412.

[2] Gabitova A.A. *Dub chereshchatyy (Quercus róbur L.) na Yuzhnom Urale: ekologo-geneticheskiy analiz populyatsionnoy struktur*y [Pedunculate oak (Quercus robur L.) in the Southern Urals: ecological and genetic analysis of the population structure]. Dis. Cand. Sci. (Biol.)]. Ufa, 2012, 18 p.

[3] Semerikov L.F. *Populyatsionnaya struktura duba chereshchatogo (Quercus róbur L.)* [Population structure of pedunculate oak (Quercus robur L.)] Issledovanie form vnutrividovoy izmenchivosti rasteniy [Research of forms of intraspecific variability of plants]. Moscow: Nauka, 1981, pp. 25–51.

[4] Politov D.V. *Primenenie molekulyarnykh markerov v lesnom khozyaystve dlya identifikatsii, inventarizatsii i otsenke geneticheskogo raznoobraziya lesnykh resursov* [Application of molecular markers in forestry for identification, inventory and assessment of the genetic diversity of forest resources]. Lesokhozyaystvennaya informatsiya [Forestry information], 2008, no. 3–4, pp. 24–27.

[5] Boronnikova S.V. *Populyatsionno-geneticheskiy monitoring genofondov redkikh resursnykh vidov rasteniy Permskogo kraya* [Population and genetic monitoring of the gene pools of rare and resource plant species in Perm region]. Flora Urala v predelakh byvshey Permskoy gubernii i ee okhrana: materialy mezhregional'noy konferentsii, posvyashchennoy 140-letiyu so dnya rozhdeniya P.V. Syuzeva [Flora of the Urals within the former Perm province and its protection: materials of the interregional conference dedicated to the 140th anniversary of the birth of P. V. Syuzev], Perm, 18–19 December 2007. Perm: Perm State National Research University, 2007, pp. 37–43.

[6] Altukhova Yu.P. *Geneticheskie protsessy v populyatsiyakh* [Genetic processes in populations]. Moscow: ICC Akademkniga, 2003, 431 p.

[7] Nechaeva Yu.S., Boronnikova S.V., Prishnivskaya Ya.V. *Molekulyarno-geneticheskiy analiz nekotorykh khvoynykh vidov rasteniy v Permskom krae* [Molecular genetic analysis of some coniferous plant species in the Perm region]. Eurasian Union of Scientists, 2014, no. 5–5, pp. 114–116.

[8] Chokheli V.A., Kozlovskiy B.L., Sereda M.M., Varduni T.V. *Rezul'taty izucheniya fenologichenskikh form Quercus robur L. s pomoshch'yu ISSR-markerov* [Results of studying the phenological forms of Quercus robur L. using ISSR markers]. Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskiy region. Seriya: Estestvennye nauki [Izvestiya vuzov. The North Caucasus region. Series: Natural Sciences], 2016, no. 2 (190), pp. 72–77.

[9] Boronnikova S.V. *Molekulyarno-geneticheskiy analiz i otsenka sostoyaniya genofondov resursnykh vidov rasteniy Permskogo kraya* [Molecular genetic analysis and assessment of the state of gene pools of resource plant species of the Perm region]. Perm': Perm State National Research University, 2013, 223 p.

[10] Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 1994, v. 20, pp. 76–183.

[11] Boronnikova S.V. I*ssledovanie geneticheskoy izmenchivosti populyatsiy redkogo vida Urala Adenophora lilifolia (L.) A.DC. na osnovanii analiza polimorfizma ISSR-markerov* [Study of genetic variability of populations of the rare Ural species Adenophora lilifolia (L.) A. DC. based on the analysis of polymorphism of ISSR markers]. Genetics, 2009, v. 45, no. 5, pp. 652–655.

[12] Svetlakova T.N. *Ekologo-geneticheskiy analiz populyatsionnoy struktury Populus tremula L. v Permskom krae* [Ecological and genetic analysis of the population structure of Populus tremula L. in the Perm region]. *Ekologicheskaya genetika* [Environmental genetics], 2012, v. 3, pp. 43–47.

[13] Reed D.H. Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. Conserv. Biol., 2003, v. 17, pp. 230–237.

[14] Lepais O., Leger V., Gerber S. High throughput microsatellite genotyping in oak species. Silvae Genetica, 2006, v. 55, pp. 238–240.
[15] Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O.,Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phonological varieties of Quércus róbur by ISSR-markers. J. of Botany, 2016, t. 2016, p. 7910451.
[16] Lefort F., Echt C., Streiff R., Vendramin G.G. Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics. Forest Genetics, 1999, no. 6 (1), pp. 15–20.
[17] Yanbaev R.Yu., Gabitova A.A., Sultanova R.R., Boronnikova S.V., Yanbaev Yu.A. *ISSR-analiz polimorfizma DNK duba chereshchatogo: argumenty v pol'zu ispol'zovaniya dlya lesovosstanovleniya semyan mestnykh nasazhdeniy* [ISSR-analysis of DNA polymorphism of oak petiolate: arguments in favor of using seeds of local plantings for reforestation]. Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta [Proceedings of the Orenburg State Agrarian University], 2017, no. 1 (63), pp. 220–222.
[18] Boronnikova S.V. *Molekulyarnoe markirovanie i geneticheskaya pasportizatsiya sokhraneniya ikh genofondov* [Molecular labeling and genetic certification of the preservation of their gene pools]. Agrarian Bulletin of the Urals, 2009, no. 2 (56), pp. 57–59.
[19] Svetlakova T.N., Boronnikova S.V., Yanbaev Y.A. Genetic diversity and differentiation in Ural populations of the aspen, Populus tremula L., as revealed by inter-simply sequence repeat (ISSR) markers. Silvae Genetica, 2014, no. 1, pp. 39–41.
[20] Kimura M., Crow J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics (US), 1964, v. 49, pp. 725–738.
[21] Nei M. Genetic distance between populations. American Naturalist, 1972, v. 106, pp. 283–292.
[22] Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, v. 76, pp. 5269–5273.
[23] *Programma i metodika po punktu 59. Plan meropriyatiy (dorozhnoy karty) «Razvitie biotekhnologii i gennoy inzhenerii», utv. rasporyazheniem Pravitel'stva RF Prirodopol'zovanie ot 18 iyunya 2013 g. №1247-r* [Program and methodology under item 59. action plan (road map) «Development of biotechnology and genetic engineering», approved by order of the Government of the Russian Federation nature Management of June 18, 2013, no. 1247-r]. Pushkino: FBU Roslesozashchita, 2014, 205 p.
[24] Kulakov E.E., Sivolapov V.A., Vorob'eva E.A., Sivolapov A.I. *Geneticheskaya izmenchivost' listvennitsy Sukacheva (Larix sukaczewii Djil.) v geograficheskikh kul'turakh pod Voronezhem* [Genetic variability of Sukachev's larch (Larix sukaczewii Dyl.) in geographical cultures near Voronezh]. Lesotekhnicheskiy zhurnal [Forest engineering magazine], 2018, no. 1 (29), pp. 35–42.
[25] Vorob'eva E.A., Kulakov E.E., Sivolapov V.A. *Osobennosti geneticheskogo raznoobraziya normal'nykh i uluchshennykh semyan roda Pinus* [Features of genetic diversity of normal and improved seeds of the genus Pinus]. Ekologicheskie i biologicheskie osnovy povysheniya produktivnosti i ustoychivosti prirodnykh i iskusstvenno vozobnovlennykh lesnykh ekosistem: materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 100-letiyu vysshego lesnogo obrazovaniya v g. Voronezh i TsChR Rossii [Ecological and biological bases for increasing the productivity and sustainability of natural and artificially renewed forest ecosystems: materials of the international scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of higher forest education in Voronezh and the Central Black Region of Russia]. Voronezh, October 04–06, 2018. Voronezh: VGLTU, 2018, t. 1, pp. 498–504.
[26] Botstein D., White R.L., Skalnick M.H., Davies R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am J. Hum. Genet., 1980, 32: 314 – 331.

Author's information

Kulakov Evgeny Evgenievich — Deputy Head of the Department of Monitoring the state of forest genetic resources of the Branch of the FBU «Roslesozaschita» — «CPF of the Voronezh region», evgenyykulakov@yandex.ru

Vorobyova Elena Anatolevna — Head of the Department of Monitoring the state of forest genetic resources of the Branch of FBU «Roslesozaschita» — «CPF of the Voronezh region», vorobyevaea@rcfh.ru

Sivolapov Vladimir Alekseevich — Cand. Sci. (Agriculture), Director of the Branch of the FBU «Roslesozashchita» — « CPF of the Voronezh region», sivalapovva@rcfh.ru

Karpechenko Nikita Aleksandrovich — Cand. Sci. (Biology), Engineer of the Department of Monitoring of forest genetic resources of the Branch of FBU «Roslesozaschita» — «CPF of the Voronezh region», nikitakarpechenko@mail.ru

Received 05.02.2021.
Accepted for publication 01.03.2021.