

ISSR-анализ полиморфизма ДНК дуба черешчатого: аргументы в пользу использования для лесовосстановления семян местных насаждений

Р.Ю. Янбаев, аспирант, А.А. Габитова, к.б.н., Р.Р. Султанова, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ; С.В. Боронникова, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Пермский ГНИУ; Ю.А. Янбаев, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Башкирский ГУ

На Южном Урале в последние несколько десятилетий наблюдается массовое усыхание дуба, причинами которого считаются чередование экстремально холодных зим, вспышки численности энтомофитовредителей и распространение заболеваний породы [1]. В результате в Башкортостане доля насаждений с преобладанием дуба в общей лесопокрытой площади уменьшилась более чем на 44% [2]. По этой причине эффективное восстановление дубрав в регионе невозможно обеспечить только за счёт естественного возобновления, без активизации лесокультурного воспроизводства данной экономически и экологически важной породы. В свою очередь этот вывод требует решения ряда вопросов, связанных с источником происхождения семенного материала для выращивания посадочного материала. Согласно приказу Рослесхоза от 08.10.2015 № 353 «Об установлении лесосеменного районирования» дубравы всех муниципальных районов Республики Башкортостан (кроме 8 северных районов) отнесены к одному лесосеменному району. Однако в регионе, где проходит восточная граница ареала, вид имеет сложную историю расселения [3], обитает в большом спектре лесорастительных условий. Его насаждения в различной степени затронуты неблагоприятными природно-климатическими и антропогенными экологическими воздействиями.

Последствия можно иллюстрировать следующим примером. Подсчитано, что деградация насаждений дуба в Башкортостане неравномерна, и доля здоровых деревьев в республике варьируется по лесничествам от 85 до 20% [2]. Эти обстоятельства требуют оценки внутрирегиональных различий состояния генофонда дубовых насаждений, который определяет потенциал для адаптивных изменений [7] и, следовательно, устойчивости и продуктивности будущих поколений лесов. Общеизвестно, что в этих целях наиболее информативными являются молекулярно-биологические методы и маркеры.

Цель исследования – с использованием ISSR-анализа ДНК провести изучение гетерозиготности и аллельного разнообразия дуба черешчатого западной части Башкортостана (материнских деревьев насаждения, подроста от самосева и растений лесных культур); сравнить полученные данные с результатами исследования полиморфизма популяций из других частей республики.

Материал и методы исследования. Пробная площадь, условно названная Кпр, заложена на

территории Кандринского лесничества Республики Башкортостан (Белебеевская возвышенность). В квартале 46 в выделе с преобладанием дуба случайным образом отобраны 32 экз., с которых собраны растительные образцы для лабораторного анализа. Вторая выборка (Кns) представляет 32 экз. подроста 1-го класса возраста от самосева под пологом древостоя Кпр. Третья выборка Кпа сформирована из 32 растений лесных культур с составом 5 С5Д, заложенных в 1999 г. на территории того же квартала. По сведениям, полученным в Кандринском лесничестве, при их создании использован семенной материал из местных насаждений дуба.

Характеристика полиморфизма выборок дуба черешчатого составлялась с использованием метода ISSR-анализа (Inter Simple Sequence Repeats) [4]. ДНК выделялась из зимних почек отобранных саженцев, подроста и деревьев. Детально характеристика праймеров, методы выделения ДНК, её амплификации, электрофореза, окрашивания продуктов амплификации, анализа электрофореграмм, статистической обработки полученных данных приведены ранее [5]. В качестве показателей полиморфизма и дифференциации использованы: среднее число аллелей n_a , эффективное число аллелей n_e [8], ожидаемая гетерозиготность H_E [9], число редких фрагментов ДНК R , доля межвыборочной подразделенности G_{ST} [10] и генетическое расстояние между растениями разных выборок I .

Полученные в настоящей работе данные сравнивали с результатами предыдущего исследования четырёх других популяций дуба черешчатого Республики Башкортостан (Татышлинское, Дмитриевское и Инзерское лесничества, обозначения выборок QrTat, QrUf и QrInz соответственно) и Оренбургской области (Кувандыкское лесничество, QrOr), выполненного с применением одних и тех же методов и показателей [2].

Результаты исследования. Между выборкой материнских деревьев и их подростом генетическое расстояние меньше ($I = 0,043$) по сравнению с величиной показателя между группой деревьев и выборкой лесных культур ($I = 0,051$). Аллельное разнообразие и гетерозиготность оказались наибольшими в группе материнских деревьев (табл. 1).

Этот феномен, видимо, вызван большей представленностью в выборке Кпр редких полиморфных фрагментов ДНК. Это предположение подтверждается при рассмотрении данных по отдельным праймерам (табл. 2).

Показатели полиморфизма у подроста (выборка Кns) меньше, по сравнению с группой деревьев, на 13,6% (H_E), 0,6% (n_a) и 4,5% (n_e). Для объяснения этого феномена можно выдвинуть следующую

1. Статистическая оценка параметров полиморфизма выборок

Популяция	H_E	n_a	n_c	R
Knp	0,221 (0,017)	1,783 (0,414)	1,358 (0,337)	7
Kns	0,191 (0,015)	1,774 (0,420)	1,297 (0,302)	2
Kna	0,170 (0,016)	1,635 (0,484)	1,268 (0,309)	1
На общую выборку	0,194 (0,001)	1,870 (0,338)	1,326 (0,295)	10

Примечание: в скобках – стандартные отклонения

2. Характеристика полиморфных фрагментов ДНК в выборках

ISSR-праймеры	Число и частота (в скобках) полиморфных фрагментов ДНК		
	Knp	Kns	Kna
M1	15 (0,714)	10 (0,526)	4 (0,286)
M3	18 (0,818)	18 (0,750)	19 (0,905)
M27	18 (0,818)	16 (0,800)	15 (0,750)
X11	18 (0,783)	16 (0,696)	16 (0,727)
X1	20 (0,909)	16 (0,800)	15 (0,750)
В среднем	89 (0,809)	76 (0,717)	69 (0,711)

гипотезу. Материнские деревья, относящиеся к перестойной группе возраста, представляют поколение, возникшее до значительной фрагментации и уменьшения площадей дубрав на Белебеевской возвышенности [1]. По этой причине они сами являются носителями прежнего, более богатого, полиморфизма. В то же время уменьшение в последние десятилетия численности деревьев насаждения и его пространственная изоляция (окружено безлесными пространствами) может не позволить воспроизводить имевшееся прежде аллельное разнообразие у подростка. В лесных культурах (группа Kna) падение полиморфизма ещё больше – на 23,1% (H_E), 8,3% (n_a) и 6,6% (n_c) по сравнению с выборкой материнских деревьев. В этом свою роль могло сыграть дальнейшее уменьшение численности деревьев – источников семенного материала, если для сбора желудей с целью их посева использовано небольшое число материнских особей.

Тем не менее сравнение результатов изучения трёх выборок из Кандринского лесничества (табл. 2) с данными по четырём популяциям западного макросклона Южно-Уральских гор показало более высокий молекулярный полиморфизм дубрав Белебеевской возвышенности. В расположенных на условной трансекте «север – юг» протяжённостью около 500 км выборках QrUf, QrTat, QrInz и QrOg установлен следующий диапазон изменений использованных показателей:

$$H_E = 0,091 - 0,126; n_a = 1,394 - 1,515; n_c = 1,143 - 1,202; I = 0 - 3.$$

Генетические расстояния в группе Кандринских выборок изменяются в пределах $I = 0,043 - 0,051$. При включении в анализ данных по выборкам дубрав из других частей Южного Урала предел изменений увеличивается до $I = 0,179 - 0,425$ (в 4,16–8,33 раза). Аналогичный результат получается при вычислении уровня межвыборочной подразделённости (табл. 3). Доля, приходящаяся на межвыборочную составляющую изменчивости, в группах Knp, Kns и Kna составила в среднем на

праймер 8,8% ($G_{ST} = 0,088 \pm 0,017$). В зависимости от использованного праймера, величина G_{ST} при одновременном анализе всех семи выборок увеличивается в 4,03–8,92 раза (в среднем на один праймер – в 6,51 раз) и составляет $G_{ST} = 0,573 \pm 0,036$. Наиболее наглядно различия в двух группах выборок и своеобразие дубрав Белебеевской возвышенности показывает дендрограмма, построенная на основе определения степени сходства выборок по частотам ISSR-спектров (рис.).

Причинами сравнительно высокого полиморфизма и генетического своеобразия дубрав на западе Башкортостана, обнаруженного при помощи ISSR-анализа, могут быть особенности истории их формирования. Они могут представлять потомство мигрантов, распространившихся на западной части современного Башкортостана из рефугиумов и убежищ Поволжья [3] и смешавшихся впоследствии с местными популяциями.

По имеющимся геоботаническим данным [1], леса с участием дуба черешчатого на западном макросклоне Южно-Уральских гор могли сформироваться под влиянием остатков древних неогеновых насаждений, переживавших плейстоценовые похолодания в местных рефугиумах. Поэтому логичным выглядит то, что эти две группы дубовых лесов были ранее распределены в два разных лесосеменных района (№ 11 «Заволжский лесостепной» и № 21 «Башкирский предгорный») [6].

Приказом Федерального агентства лесного хозяйства от 08.10.2015 № 353 «Об установлении лесосеменного районирования» с изменениями от 28 марта 2016 г. № 100 в настоящее время они объединены в один общий лесосеменной район. Это обстоятельство препятствует выполнению главной задачи лесосеменного районирования – рациональному использованию географической внутривидовой изменчивости для выращивания высокопродуктивных и устойчивых лесных насаждений с сохранением генофонда популяций, сформированных за много поколений под действием

3. Межвыборочная подразделённость

ISSR-праймер	Группа выборок		Кратность различий двух групп выборок
	Кnp, Кns, Кna	Кnp, Кns, Кna, QrUf, QrTat, QrInz, QrOr	
M1	0,155	0,625	4,03
M3	0,076	0,468	6,16
M27	0,082	0,628	7,66
X11	0,072	0,642	8,92
X1	0,057	0,504	8,84
>±r	0,088±0,017	0,573±0,036	6,51

Примечание: >±r – среднее значение G_{ST} и его ошибка

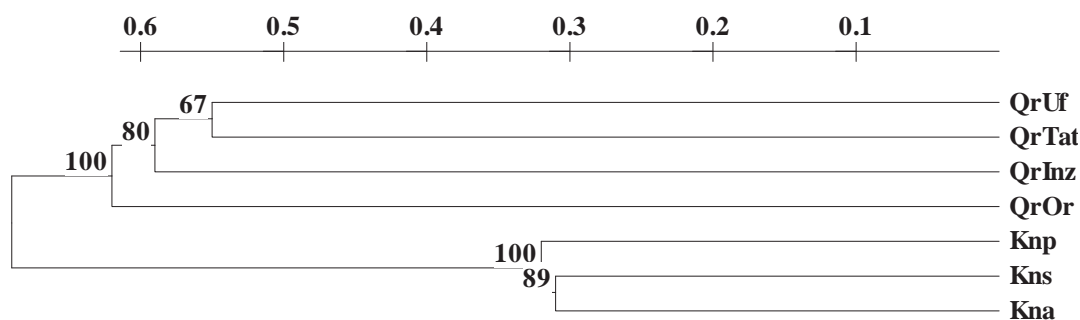


Рис. – Дендрограмма, построенная UPGMA-методом по ISSR-спектрам для выборок *Q. robur*. На шкале сверху – генетические расстояния

естественного отбора и других микроэволюционных сил [6]. По этой причине нами рекомендуется подразделение дубрав Южного Урала в исследованной части региона на два подрайона – территории, характеризующиеся не только большим сходством лесорастительных условий, но и более однородным генофондом.

Вывод. Насаждения дуба черешчатого в западной части Башкортостана дифференцированы от дубовых насаждений широколиственно-лесной зоны республики, что противоречит их отнесению к одному общему лесосеменному району. Для сохранения генофонда дубрав Белебеевской возвышенности при осуществлении лесокультурного производства рекомендуется использование местного семенного материала. При его заготовке необходимо использование как можно большего числа семенных деревьев.

Литература

1. Попов Г.В. Леса Башкирии. Уфа: Башк. кн. изд-во, 1980. 144 с.
2. Габитова А.А. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) на Южном Урале: эколого-генетический анализ популяционной структуры: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Уфа, 2012. 18 с.
3. Семериков Л.Ф. Популяционная структура дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) // Исследование форм внутривидовой изменчивости растений. М.: Наука, 1981. С. 25–51.
4. Молекулярная генетика: учеб.-метод. пособие / Под ред. С.В. Боронниковой. Пермь, 2007. 150 с.
5. Янбаев Р.Ю. О лесовосстановительных процессах в дубравах Южного Урала по данным ISSR-анализа // Вестник Башкирского университета. 2016. № 4. С. 943–948.
6. Лесосеменное районирование основных лесообразующих пород в СССР / Гос. ком. СССР по лесн. хоз-ву. М.: Лесная промышленность, 1982. 368 с.
7. Reed D.H., Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity // Conserv. Biol. 2003. V. 17. P. 230–237.
8. 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.
9. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.
10. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, 1975. 278 p.