

УДК: 10.18522/2308-9709-2020-34-2
<https://new.jbks.ru/archive/issue-34/article-2>

Методика расчёта средней ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* L. (Fagaceae) из разных экотопов

[Дмитриев П. А.¹](#), [Козловский Б. Л.²](#), [Вардуни Т. В.³](#), [Чохели В. А.⁴](#), [Раджпут В. Д.⁵](#), [Степаненко В. В.⁶](#), [Азаров А. С.⁷](#), [Бакулин С. Д.⁸](#)

1. Старший научный сотрудник лаборатории биоразнообразия НИИ Биологии ЮФУ.
2. Место работы (полностью): Ботанический сад Южного федерального университета
3. Директор ботанического сада ЮФУ
4. Должность: младший научный сотрудник
5. Ученое звание: Доктор
6. Должность: биолог
7. Южный федеральный университет, Академия Биологии и Биотехнологии им. Д.И. Ивановского, лаборатория молекулярной генетики
8. Ботанический сад ЮФУ

В статье описываются два методических подхода по расчёту средней ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* из разных экотопов. Изученные 13 ценопопуляций дуба черешчатого на территории Ростовской области, в зависимости от условий их произрастания, были разделены на три экотопа. Экотоп байрачных лесов – это древесные насаждения, которые произрастают только по склонам балок (байраков). Экотоп аренных лесов – это древостои, находящиеся на аренах (песчаных массивах надпойменных террас). Экотоп пойменных лесов – это ценопопуляции, расположенные в пойме реки. Исследование генетических характеристик ценопопуляций проводили методом ПЦР с использованием пяти олигонуклеотидных праймеров. Использовали метод межмикросателлитного анализа (ISSR-анализ). В первом методе расчёт средней ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* из разных экотопов проводили с помощью средне взвешенного анализа, усредняя данные по каждой ценопопуляции входящей в экотоп. Во втором методе расчёта мы объединили изученные аллельные варианты (бинарные матрицы) по каждой ценопопуляции в три кластера (экотопа), и полученные общие матрицы пересчитали с использованием программы PopGen. Сравнение средних значений ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* для каждого экотопа проводили попарно с использованием t-критерия Стьюдента. Все экотопы, рассчитанные на основе средне взвешенного анализа, характеризуются достоверными различиями по уровню ожидаемой гетерозиготности (He) при уровне значимости $p=0,05$. Все экотопы, рассчитанные на основе общих матриц, характеризуются достоверными различиями по уровню ожидаемой гетерозиготности (He) при уровне значимости $p=0,01$. Цель данной работы – провести сравнительный анализ двух предложенных методик расчёта средней ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* из разных экотопов.

Введение

На большей части ареала *Q. robur* его популяционная структура достаточно детально исследована [11,13,4]. Однако на южной границе равнинной части ареала *Q. robur* (где расположена и Ростовская область) факторы формирования и поддержания генофонда вида недостаточно изучены, в особенности с применением информативных и современных молекулярно-биологических методов. В связи с этим актуальным является анализ эколого-генетических характеристик ценопопуляций *Q. robur* с использованием молекулярных маркеров для количественной оценки популяционно-генетических параметров. Решение данной проблемы в будущем позволит разработать научные основы и системные меры для увеличения устойчивости дубовых насаждений к неблагоприятным факторам среды. Комплексный подход с использованием современных методов анализа даёт возможность оценить эколого-генетические характеристики дубовых насаждений, сохранить и рационально использовать генофонд дуба черешчатого, совершенствовать в регионе лесное хозяйство.

Материалы и методы исследований

Для ценопопуляционных исследований объектами послужили деревья *Q. robur* из различных мест произрастания. Отобранные нами ценопопуляции произрастали в естественном ареале *Q. robur* на территории Ростовской области.

Живые и биокосные системы

Дмитриев П. А., Козловский Б. Л., Вардуни Т. В., Чохели В. А., Раджпут В. Д., Степаненко В. В., Азаров А. С., Бакулин С. Д.

Методика расчёта средней ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* L. (Fagaceae) из разных экотопов

Изученные ценопопуляции систематизировали по различным экологическим условиям произрастания (экотопам) [2,6]. Характеристики и описания представлены в нашей предыдущей работе [7].

Выделение тотальной ДНК из гомогенизированных образцов, навесками по 50 мг, которые предварительно были продезинфицированы и обработаны слабым раствором гипохлорита натрия. Выделение ДНК проводили с использованием сорбентного метода при помощи коммерческого набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Россия). Концентрацию ДНК определяли по стандартным методикам в соответствии с протоколом производителя на анализаторе Qubit 3.0 (Invitrogen, США), после чего все образцы ранжировали до концентрации 5 нг/мкл.

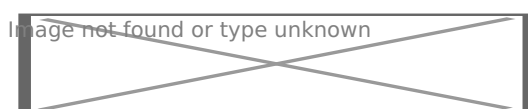
Для генетического анализа использовался межмикросателлитный (ISSR) анализ. ISSR-праймеры подбирались на основе литературных данных (из набора UBC Primer Set #9) [12, 16]. Характеристика праймеров представлена в наших предыдущих работах [9,10,7].

ПЦР-смесь готовили в нескольких вариациях, в зависимости от концентрации магния. Постоянные компоненты из расчёта на один образец: 25 мМ раствор нуклеотидов dNTP- 2,5 мкл, 10×буфер для ПЦР – 2,5 мкл, мутантная Taq-полимераза – 0,2 мкл (5 ед./мкл), ДНК-матрица (концентрация 5 нг/мкл) – 1 мкл, праймер (10 пМ/мкл) – 1 мкл. Переменные компоненты: H₂O (DD) – 15,8 мкл, 25 мМ хлорид магния (MgCl₂) – 2 мкл; H₂O (DD) – 15,3 мкл, 25 мМ хлорид магния (MgCl₂) – 2,5 мкл; H₂O (DD) – 14,8 мкл, 25 мМ хлорид магния (MgCl₂) – 3 мкл. Общий объём ПЦР-смеси составил 25 мкл. Амплификация проводилась в термоциклере T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, США) и C1000 Thermal Cycler (BIO-RAD, США). Протокол амплификации: 1. 94 °C – 5:00 мин; 2. 94 °C – 0:30 сек; 3. Та °C – 0:45 сек; 4. 72 °C – 2:00 мин; 5. 35 циклов пункты 2-4; 6. 72 °C – 5:00 мин.; 7. Хранение при 12 °C.

Разделение фрагментов проводили электрофорезом в 2 %-м агарозном геле с использованием 1×TBE-буфера (Tris, Boric acid, EDTA) при напряжении 90 В, 3 часа, источник питания – PowerPacBasic (Bio-Rad, США). Пробирки с ампликонами предварительно смешивали с 2 мкл загрузочного красителя состава бромфеноловый синий + глицерин. Окрашивание ДНК производили красителем SYBR Green I x80 (Lumiprobe, США) из соотношения 2 мкл красителя на 5 мкл ампликонов, съемку – в геледокументирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США) с программным обеспечением ImageLab версии 6.0 (Bio-Rad, США). Маркер длин ДНК фрагментов 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия) добавляли по 7 мкл в лунку.

Компьютерную обработку полученных данных проводили при помощи приложения MS Excel (Microsoft Office 2007) где строили бинарную матрицу, отражающую наличие (1) или отсутствие (0) фрагмента. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты, изменчивость по интенсивности не учитывалась. Компьютерный анализ полиморфизма ДНК проводился с использованием программы POPGENE 1.32 [15] для определения ожидаемой гетерозиготности (He) [14].

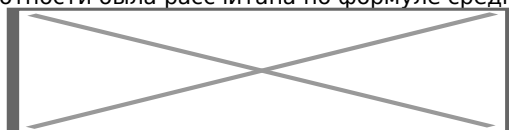
Параметр ожидаемой гетерозиготности (He), который вычислялся для каждого локуса на основании его аллельных частот, посредством следующего соотношения:



Результаты исследований

На основании анализа полученных электрофореграмм установлено, что число ISSR-фрагментов на общую проанализированную выборку варьировало от 40 (праймер UBC 811) до 49 (праймер UBC 880). Среднее число фрагментов составило 45,5; всего детектировано 226 фрагментов (табл. 2). Длина фрагментов укладывалась в диапазон от 200 п.н. (праймер UBC 857) до 1650 п.н. (праймеры UBC 841 и UBC 880). Для изученных ценопопуляций *Q. robur* были рассчитаны основные показатели генетической изменчивости [7].

Распределение ожидаемой гетерозиготности (He) в среднем по всем ценопопуляциям составило 0,3848, где минимальная ожидаемая гетерозиготность установлена для ценопопуляции Кп – Кундрюченские пески (He = 0,1627), а максимальная – для ценопопуляции Л – урочище «Липяги» (He = 0,3485) (табл. 1). В качестве первого метода расчёта средней ожидаемой гетерозиготности была рассчитана по формуле среднего взвешенного:



По второй методике расчёта мы объединили изученные аллельные варианты (бинарные матрицы) по каждой ценопопуляции в три кластера (экотопа), и полученные общие матрицы пересчитали с использованием программы

PopGen (табл.1).

Сравнение средних значений ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* для каждого экотопа проводили попарно с использованием t-критерия Стьюдента [5,8,13].

Таблица 1 – Уровень генетического разнообразия экотопов *Quercus robur*

Экотоп	H_e	
	Среднее взвешенное	Общие матрицы
Байрачный экотоп	0,2965*	0,2105**
Аренный экотоп	0,3104*	0,2647**
Пойменный экотоп	0,3140*	0,3009**

* достоверные различия по t-критерию Стьюдента при уровне значимости 0,05

** достоверные различия по t-критерию Стьюдента при уровне значимости 0,01

Все экотопы рассчитанные на основе общих матриц характеризуются достоверными различиями по уровню ожидаемой гетерозиготности. Достоверность отличий рассчитывали по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $p=0,01$ по уровню ожидаемой гетерозиготности (H_e) также проводили попарно между парами:

байрачного и аренного экотопа ($t_{\phi}=4,2075 > t_{кр}=2,5758$);

пойменного и аренного экотопа ($t_{\phi}=2,8754 > t_{кр}=2,5758$);

байрачного и пойменного экотопа ($t_{\phi}=6,8718 > t_{кр}=2,5758$).

Так, среди природных ценопопуляций дуба черешчатого наивысшим уровнем ожидаемой гетерозиготности обладает пойменный экотоп (0,3009), а наименьшим – байрачный (0,2105).

Различия в уровне ожидаемой гетерозиготности ценопопуляций *Quercus robur* одинаковых экотопов, рассчитанные с помощью средневзвешенного и общей матрицы, возможно связаны с различными пропорциями исследованных локусов. При анализе через средневзвешенное, математически усредняли лишь показатели H_e , в то время как при анализе общей матрицы усреднение было по всем исследованным локусам.

Заключение

Данные по уровню ожидаемой гетерозиготности с использованием двух различных методик расчета показывают достоверность при различных уровнях значимости ($p=0,05$ и $p=0,01$). Поскольку достоверность результатов при анализе среднего уровня ожидаемой гетерозиготности экотопа выше с использованием общих матриц, предпочтительнее вести расчёты с использованием данного метода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0852-2020-0029).

Литература

1. Габитова А. А. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) на южном Урале: эколого-генетический анализ популяционной структуры // Автореф. дисс... канд. биол. наук. Уфа, 2012. 19 с.
2. Зозулин Г. М. Леса Нижнего Дона. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1992. 200 с.
3. Каган Д. И. Популяционно-генетическая структура дуба черешчатого в лесосеменных плантациях и насаждениях Белорусского полесья // Дисс... канд. биол. наук. Гомель, 2012. 162 с.
4. Карпеченко Н. А. Анализ белковых спектров ферментов метаболических путей и инвертированных повторов ДНК древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в лесостепи Европейской части Российской Федерации // Дисс... канд. биол. наук. Воронеж, 2014. 137 с.
5. Мельникова М. Н., Сенчукова А. Л., Павлов С. Д. Оценка эффективности применения ISSR-маркеров для генетической дифференциации камчатских популяций микижи *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: тезисы докладов XV Междунар. науч. конф. (Петропавловск-Камчатский, 18-19 ноября 2014 г.). Петропавловск-Камчатский, 2014. С. 67-70.
6. Турчин Т. Я., Коробова Я. В. Ландшафтные основы изучения пойменных лесов степного Придонья // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2014. № 7(117). С. 70-74.
7. Чохели В. А., Каган Д. И., Вардуни Т. В., Козловский Б. Л., Середина М. М., Капралова О. А., Дмитриев П. А., Падутов В. Е. Эколого-генетическая дифференциация ценопопуляций *Quercus robur* L. на территории Ростовской области с применением ISSR-маркеров // Turczaninowia, 2018. № 21(4). С. 161-167.
8. Шейкина О. В., Гладков Ю. Ф., Криворотова Т. Н. ISSR анализ выборок деревьев из насаждений сосны обыкновенной, произрастающих в контрастных почвенных условиях // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. науч. статей по материалам Тринадцатой междунар. науч.-практ. конф. (Барнаул, 20-23 октября 2014 г.). Барнаул, 2014. С. 263-265.
9. Chokheli V., Kagan D., Rajput V., Kozlovsky B., Sereda M., Shmaraeva A., Khibuhina T., Fedyaeva V., Shishlova Zh., Dmitriev P., Varduny T., Kapralova O., Usatov A. Genetic variability in cenopopulations of pedunculate oak (*Quercus robur*) in Rostov Region, Russia, with the use of ISSR-markers // International Journal of Agriculture and Biology, 2018. V. 20(11). Pp. 2544-2548.
10. Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phenological varieties of *Quercus robur* by ISSR-markers // Journal of Botany, 2016: Article ID 7910451.
11. Ducouso A., Bordacs S. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2004. 6 p.
12. Godwin I. D., Aitken E. A. B., Smith L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics // Electrophoresis, 1997. V. 18. pp. 1524 -1528.
13. Grativol C., Lira-Medeiros C. F., Hemery A. S., Ferreira P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions // Mol. Biol. Rep., 2011. V. 38(7). Pp. 4245-4256.
14. Nei M. Molecular evolutionary genetics // N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. P. 176-187
15. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. B. J., Ye Z. H. and Mao J. X. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis // Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 1997.
16. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. V. 20. Pp. 176-183.

Literatura

1. Gabitova A. A. Dub chereschatyj (*Quercus robur* L.) na juzhnom Urale: jekologo-geneticheskij analiz populjacionnoj struktury // Avtoref. diss... kand. biol. nauk. Ufa, 2012.
2. Zozulin G. M. Lesa Nizhnego Dona. Rostov-na-Donu: Izd-vo Rostovskogo un-ta, 1992. – 200 s.
3. Kagan D. I. Populjacionno-geneticheskaja struktura duba chereschatogo v lesosemennyyh plantacijah i nasazhdenijah Belorusskogo poles'ja // Diss... kand. biol. nauk. Gomel', 2012. – 162 s.
4. Karpechenko N. A. Analiz belkovykh spektrov fermentov metabolicheskikh putej i invertirovannykh povtorov DNK drevesnykh rastenij duba chereschatogo, proizrastajushhih v lesostepi Evropejskoj chasti Rossijskoj federacii // Diss... kand. biol. nauk. Voronezh, 2014. – 137 s.
5. Mel'nikova M. N., Senchukova A. L., Pavlov S. D. Ocenka jeffektivnosti primenenija ISSR-markerov dlja geneticheskoi differenciacii kamchatskih populjacij mikizhi *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* // Sohranenie bioraznoobrazija Kamchatki i priliegajushhih morej: tezis dokladov XV Mezhdunar. nauch. konf. (Petropavlovsk-Kamchatskij, 18-19 nojabrja 2014 g.). Petropavlovsk-Kamchatskij, 2014. – S. 67-70.
6. Turchin T. Ja., Korobova Ja. V. Landshaftnye osnovy izuchenija pojmennyh lesov stepnogo Pridon'ja // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2014. – № 7(117). – S. 70-74.
7. Choheli V. A., Kagan D. I., Varduni T. V., Kozlovskij B. L., Sereda M. M., Kapralova O. A., Dmitriev P. A., Padutov V. E. Jekologo-geneticheskaja differenciacija cenopuljacij *Quercus robur* L. na territorii Rostovskoj oblasti s primeneniem ISSR-markerov // Turczaninowia. – 2018. – № 21(4). – S. 161-167.

8. Shejkina O. V., Gladkov Ju. F., Krivorotova T. N. ISSR analiz vyborok derev'ev iz nasazhdenij sosny obyknovennoj, proizrastajushhij v kontrastnyh pochvennyh uslovijah // Problemy botaniki Juzhnoj Sibiri i Mongolii: sb. nauch. statej po materialam Trinadcatoj mezhdunar. nauchn.-prakt. konf. (Barnaul, 20-23 oktjabrja 2014 g). Barnaul, 2014. – S. 263-265.
9. Chokheli V., Kagan D., Rajput V., Kozlovsky B., Sereda M., Shmaraeva A., Khibuhina T., Fedyaeva V., Shishlova Zh., Dmitriev P., Varduny T., Kapralova O., Usatov A. Genetic variability in cenopopulations of pedunculate oak (*Quercus robur*) in Rostov Region, Russia, with the use of ISSR-markers // International Journal of Agriculture and Biology. – 2018. – V. 20(11). – Pr. 2544-2548.
10. Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phenological varieties of *Quercus robur* by ISSR-markers // Journal of Botany 2016: Article ID 7910451.
11. Ducouso A., Bordacs S. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2004. – 6 p.
12. Godwin I. D., Aitken E. A. B., Smith L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics // Electrophoresis. – 1997. – V. 18. – Pp. 1524 -1528.
13. Grativol C., Lira-Medeiros C. F., Hemery A. S., Ferreira P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions // Mol. Biol. Rep. – 2011. – V. 38(7). – Pp. 4245-4256.
14. Nei M. Molecular evolutionary genetics // N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. – P. 176-187
15. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. B. J., Ye Z. H. and Mao J. X. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis // Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 1997.
16. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – V. 20. – Pp. 176-183.