

ОБ ИЗУЧЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ РОДА *PICEA* В РОССИИ И БЕЛАРУСИ

© 2023

Дегтярева А.П.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии
(г. Воронеж, Российская Федерация)

Аннотация. В настоящее время в различных регионах России наблюдается деградация еловых насаждений, что связано с трансформацией климатических и экологических условий окружающей среды. Чтобы обеспечить эффективное лесовосстановление и лесоразведение еловых лесов, необходимо изучение особенностей популяционно-генетической структуры насаждений для сохранения генетических ресурсов ценных лесообразующих древесных видов. Целью данной работы является обзор современных достижений в исследовании молекулярных маркеров рода *Picea* в России и Белоруссии. Для характеристики генетического разнообразия популяций ели отобрано 9 ISSR праймеров с высоким уровнем полиморфности (86,6%): (GA)9T, (AC)8C, (CA)6RY, (CA)6RG, (CA)6(GT), (CA)6(AC), (AG)8T, (GA)8C и (AG)8YT. Анализ локуса *mh44* митохондриальной ДНК обнаружил 13 аллельных вариантов и подходит для изучения генетического разнообразия внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости ели. Экспериментальные работы с митохондриальным геном *Nad1* показали возможность его применения для филогеографических исследований ели. Оценка генетической изменчивости микросателлитных локусов Pt63718, Pt26081, Pt71936 обнаружила 19 аллельных вариантов и также подходит для филогеографических исследований. Приведенные результаты являются очень ценными и могут составлять основу для изучения и характеристики генетической структуры еловых насаждений.

Ключевые слова: экология; деградация лесных экосистем; еловые леса; популяционно-генетические исследования; молекулярные маркеры; полиморфизм.

ON THE STUDY OF MOLECULAR MARKERS OF THE GENUS *PICEA* IN RUSSIA AND BELARUS

© 2023

Degtyareva A.P.

All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology (Voronezh, Russian Federation)

Abstract. Currently, degradation of spruce stands is observed in various regions of Russia, which is associated with the transformation of climatic and environmental conditions of the environment. To ensure effective reforestation and afforestation of spruce forests, it is necessary to study the features of the population-genetic structure of plantations in order to preserve the genetic resources of valuable forest-forming tree species. The purpose of this work is to review modern achievements in the study of molecular markers of the genus *Picea* in Russia and Belarus. To characterize the genetic diversity of spruce populations, 9 ISSR primers with a high level of polymorphism (86,6%) were selected: (GA)9T, (AC)8C, (CA)6RY, (CA)6RG, (CA)6(GT), (CA)6(AC), (AG)8T, (GA)8C and (AG)8YT. The analysis of the *mh44* locus of mitochondrial DNA revealed 13 allelic variants and is suitable for studying the genetic diversity of intra- and inter-population genetic variability of spruce. Experimental work with the mitochondrial *Nad1* gene has shown the possibility of its application for phylogeographic studies of spruce. The assessment of the genetic variability of microsatellite loci Pt63718, Pt26081, Pt71936 revealed 19 allelic variants and is also suitable for phylogeographic studies. These results are very valuable and can form the basis for studying and characterizing the genetic structure of spruce plantations.

Keywords: ecology; degradation of forest ecosystems; spruce forests; population genetic studies; molecular markers; polymorphism.

Изучение и сохранение разнообразия генетических ресурсов лесных древесных растений является актуальной задачей исследователей современности. Сокращение и потеря генетического разнообразия по причине изменения окружающей среды и, как следствие, деградация лесных насаждений представляют собой острую проблему настоящего времени. Изменения окружающей среды происходят как по естественным причинам, так и вследствие усиливающейся антропогенной нагрузки. Для сохранения и воспроизводства лесов важно изучать генетическую структуру и изменчивость основных лесообразующих видов, сохранять богатство генофонда популяций [1, с. 58].

Ель обладает широким ареалом произрастания на территории России. Данная порода относится к основным лесообразующим, имеет хозяйственно цен-

ное значение, выполняет противозерозионные и средообразующие функции [2, с. 1106]. В настоящее время из-за активной хозяйственной деятельности человека повсеместно фиксируется антропогенное загрязнение окружающей среды, вследствие чего прогрессирует изменение климата: повышение температуры, снижение числа осадков, формируются засухи [3, с. 14]. Данный факт влечет за собой активизацию деятельности вредителей и болезней в еловых лесах, влияет на качество древесины, способствует снижению устойчивости, усыханию и дальнейшей гибели деревьев и целых популяций [4, с. 304; 5, с. 28; 6, с. 21]. Поэтому актуальной задачей для эффективного сохранения и воспроизводства генетических ресурсов ценных лесообразующих видов является поиск молекулярных маркеров и изучение генетического разнообразия еловых лесов.

Популярным и развивающимся способом исследования генетического разнообразия являются молекулярные маркеры [7, с. 32]. В современной науке использование молекулярных маркеров широко применяется учеными во всем мире. Благодаря использованию ДНК-маркеров становится возможным выявлять генетическое разнообразие популяций, создавать генетические паспорта сортов, линий и гибридов различных растений [8, с. 386]. Для селекции молекулярные маркеры имеют очень большое значение: данный метод позволяет в более короткий срок, чем классические методы селекции, выявить генетические маркеры хозяйственно ценных признаков и применять их для сохранения селекционных достижений [9, с. 69]. Молекулярные маркеры позволяют выявлять механизмы адаптации растений к изменяющимся экологическим особенностям состояния окружающей среды [10, р. 403].

В современных генетических исследованиях рода *Picea* используют методы с применением мультилокусных ISSR ДНК-маркеров (маркеры, основанные на межмикросателлитных последовательностях (Inter Simple Sequence Repeats)), митохондриальных ДНК-маркеров, хлоропластных (цитоплазматических) молекулярных маркеров и ядерных последовательностей [11, с. 13]. Для характеристики генетической структуры популяций в анализ включают не менее 15 микросателлитных маркеров, однако если применяются SNPs (полиморфные маркеры с однонуклеотидными заменами), то это число должно быть увеличено. Известно, что уровень полиморфизма зависит от типа выбранного молекулярного маркера. Самый высокий уровень внутривидового полиморфизма встречается в исследованиях с применением SSR (микросателлиты), SNPs и DArT, далее по степени снижения полиморфности располагаются ISSR маркеры, AFLP и замыкают этот список RAPD, RFLP и CAPS [12, с. 220]. Именно высокий уровень полиморфности позволяет рекомендовать к использованию тот или иной маркер, так как обеспечивает хорошую разрешающую способность, при которой фиксируются наибольшие различия в генотипах исследуемых образцов. Исходя из этого, SNPs, SSR и DArT, выявляющие самые высокие уровни полиморфизма, являются наиболее продуктивными для исследований генетического разнообразия любых видов рода *Picea* [13, с. 19].

Целью данной работы является обзор и отражение основных результатов современных исследований молекулярных маркеров рода *Picea* в России и Белоруссии.

В работе О.В. Шейкиной с соавторами [14] исследования генетической структуры плюсовых деревьев ели обыкновенной проводились с использованием 15 ISSR маркеров. Исследование генетического разнообразия и тестирование отобранных ДНК-маркеров проводили на 26 клонах *Picea abies* L. в Учебно-опытном лесхозе Поволжского государственного технологического университета. По результатам исследований было отобрано 9 ISSR маркеров, доля полиморфных локусов которых составила 86,6%: (GA)9T, (AC)8C, (CA)6RY, (CA)6RG, (CA)6(GT), (CA)6(AC), (AG)8T, (GA)8T, (AG)8YT. Такой высокий уровень полиморфизма отобранных праймеров позволяет рекомендовать их для анализа большого количества генотипов ели.

Отобранные в исследованиях О.В. Шейкиной 9 перспективных ISSR маркеров применялись в работе

А.А. Прохоровой с соавторами [15, с. 91]. В статье изучено генетическое разнообразие и филогеографическое происхождение клоновых потомств ели гибридной (финской) (*Picea × fennica* (Regel) Kom.), произрастающих на архиве клонов, который представлен плюсовыми деревьями из различных регионов России. По результатам проведенных исследований с использованием 9 ISSR был выявлен высокий уровень полиморфных локусов – 97%. Представлены полученные результаты генетической структуры популяций плюсовых деревьев ели гибридной в таблице 1.

Проанализировав показатели генетической дистанции, авторы установили, что наиболее удалены плюсовые деревья Марий Эл и Удмуртии, а наименее – Марий Эл и Нижегородской области, при этом значение показателя генетической дистанции варьировало в пределах 0,0328–0,2295. Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа потомств клонов ели гибридной сделали возможным выделить 3 группы деревьев по географическому происхождению: 1 – из Марий Эл и Нижегородской области, 2 – из Кировской и Пермской областей, 3 – из Удмуртии.

В статье А.К. Экарт с соавторами [16, с. 842] изучена перспектива использования минисателлитного локуса *mh44* митохондриальной ДНК (мтДНК) для исследования внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости ели сибирской, а также для анализа истории географического распространения популяций *Picea obovata* Ledeb. Объектом исследования послужили 24 выборки (всего 720 деревьев) популяций ели сибирской в Красноярском крае, республиках Алтай, Хакасия, Тыва, Бурятия, Якутия, в Новосибирской, Иркутской, Магаданской и Амурской областях, а также в Монголии.

По результатам молекулярно-генетического анализа локуса *mh44* обнаружено 13 аллельных вариантов. Число выявленных аллелей варьирует от 1 до 11 и в среднем составляет $5,54 \pm 0,69$. Исследуемый локус *mh44* мтДНК оказался мономорфным в популяциях ели из Магаданской области, Якутии и Бурятии. При этом самый высокий уровень полиморфизма отмечен в популяции ели сибирской из Хакасии.

Анализ молекулярной изменчивости AMOVA показал, что межпопуляционная изменчивость 24 популяций ели сибирской составила 25% ($\Phi_{iPT} = 0,253$, $P = 0,01$) – это достаточно высокое значение, а на долю внутривидовой изменчивости приходится 75% всего наблюдаемого генетического разнообразия по локусу *mh44*.

На основании проведенных исследований авторы заключили, что локус *mh44* не отвечает предъявляемым требованиям для филогеографических исследований ели сибирской. Однако, учитывая высокий процент изменчивости и межпопуляционной дифференциации, данный локус *mh44* может быть использован совместно с другими маркерами мтДНК для изучения пространственной генетической структуры внутри популяции и на межпопуляционном уровне, а также для решения ряда других проблем популяционной генетики, использующих молекулярно-генетические маркеры.

В работе Е.К. Потокиной с соавторами [17, с. 818] произведен анализ генетической изменчивости митохондриального гена *Nad1* в 28 климатипах географических культур ели *P. abies* и *P. obovata* из разных регионов европейской России с целью изучения исторического распространения видов на исследуемых

территориях. По результатам анализа 221 дерева из географических культур ели выявлено 9 аллельных вариантов гена *Nad1*. Анализ частот встречаемости аллелей гена *Nad1* среди всех изученных климатипов ели выявил аллель длиной 721 пар нуклеотидов как наиболее распространенный. Установили, что все ели по полиморфизму гена *Nad1* возможно разделить на кластеры: «северная семья» *P. abies* – ели данного кластера произрастают в странах северной Европы и в европейской части России; «южная семья» *P. abies* – ели данного кластера произрастают в Закарпатье, к виду *P. obovata* отнесли все образцы елей из Красноярского края и экземпляр из восточного пункта Свердловской обл.

Исследования генетической структуры еловых лесов Белоруссии отражены в научной работе В.Е. Падутова с соавторами [18, с. 439]. В статье изложены исследования 57 древостоев *P. abies* естественного происхождения на территории Белоруссии. Для изучения исторического происхождения и распространения вида *P. abies* на территории страны, а также для характеристики генетической структуры насаждений использовали 3 микросателлитных локуса хлоропластной ДНК (хпДНК) Pt63718, Pt26081 и Pt71936, для которых обнаружено 19 аллельных вариантов. Анализ мтДНК выполнен по локусу mt15-D002, для которого обнаружено 2 аллельных варианта.

Авторы установили, что на территории южной границы распространения *P. abies*, некоторые аллельные варианты микросателлитных локусов хлоропластной ДНК имеют свою специфику по сравнению со средними значениями по виду для Белоруссии. Такие результаты, по-видимому, можно объяснить особенностью распространения изучаемого древесного вида в направлении «юг – север» и «запад – восток». Анализ мтДНК *P. abies* также обнаружил высокую долю полиморфных локусов и иллюстрирует особенности исторического происхождения *P. abies* в границах исследуемой территории: зафиксированы особи южного карпатского и северного бореального происхождения.

Изучение ДНК маркеров является актуальным направлением для характеристики популяционно-генетической структуры еловых насаждений, а также может быть использовано для выявления механизмов адаптации видов рода *Picea* к изменениям окружающей среды: известно, что с повышением генетической изменчивости популяции, происходит повышение ее экологической пластичности [19, с. 3].

Объединили данные, собранные в ходе обзора, в таблицу (табл. 2), где отразили регион исследования, используемые молекулярные маркеры и основные выводы.

Таблица 1 – Генетическое разнообразие клоновых потомств ели гибридной из разных регионов РФ по результатам анализа [15, с. 91]

Географическое происхождение	Наблюдаемое число аллелей	Эффективное число аллелей	Генетическое разнообразие по Nei	Индекс Шеннона
Республика Марий Эл	1,911	1,441	0,270	0,418
Нижегородская обл.	1,887	1,484	0,286	0,433
Удмуртская Республика	1,554	1,341	0,199	0,299
Пермская обл.	1,577	1,272	0,168	0,261
Кировская обл.	1,542	1,286	0,172	0,264
Знач. общ. по виду	1,970	1,463	0,283	0,439

Таблица 2 – Основные выводы из исследований генетической структуры рода *Picea* в России и Белоруссии

№	Регион исследования	Вид растения	Молекулярный маркер	Основной вывод	Ссылка
1	26 клонов плюсовых деревьев, г. Йошкар-Ола	<i>Picea abies</i> L.	15 ISSR: (GA)9T, (AC)8C, (AC)8G, (CA)6RY, (CA)6RG, (CA)6(GT), (CA)6(AC), (AG)8T, (GA)8T, (AG)8YT, (AG)8YA, (AG)8C, (CA)8G, (TG)8A, (CT)8RC	9 полиморфных ISSR подходят для популяционно-генетических исследований <i>Picea abies</i> L.: (GA)9T, (AC)8C, (CA)6RY, (CA)6RG, (CA)6(GT), (CA)6(AC), (AG)8T, (GA)8C и (AG)8YT	[14]
2	Клоновые потомства из Марий Эл, Удмуртии, Нижегородской, Кировской и Пермской обл.	<i>Picea fennica</i> (Regel) Kom	9 ISSR: (GA)9T, (AC)8C, (CA)6RY, (CA)6RG, (CA)6(GT), (CA)6(AC), (AG)8T, (GA)8C и (AG)8YT	Изученные ISSR имеют высокий уровень генетической изменчивости, подходят для филогеографических исследований	[15, с. 91]
3	Популяции ели из азиатской части ареала ее распространения	<i>Picea obovata</i> Ledeb.	Минисателлитный локус <i>mh44</i> мтДНК	Изученный локус мтДНК подходит для характеристики генетической структуры популяции	[16, с. 842]
4	28 климатипов ели из европейской части России	<i>Picea abies</i> , <i>Picea obovata</i>	Митохондриальный ген <i>Nad1</i>	Анализ изменчивости митохондриального гена <i>Nad1</i> перспективен для популяционно-генетических и филогеографических исследований	[17, с. 818]
5	57 древостоев Белоруссии	<i>Picea abies</i>	Микросателлитные локусы хпДНК: Pt63718, Pt26081, Pt71936; локус мтДНК mt15-D002	Изученные локусы проявляют высокое аллельное разнообразие и применимы для филогеографических исследований	[18, с. 439]

Таким образом, из обзора современных молекулярно-генетических исследований еловых насаждений России и Белоруссии можно сделать заключение, что представленные в таблице молекулярные маркеры подходят как для характеристики генетической структуры внутри популяций ели, так и между популяциями, а также для изучения истории географического распространения и формирования ареала распространения деревьев рода *Picea* и определения их видовой принадлежности.

Список литературы:

1. Паленова М.М., Коротков В.Н., Нотов А.А., Сильнягина Г.В., Кинигопуло П.С., Золина Т.А., Югов А.Н. Состояние и задачи совершенствования учета и оценки видового разнообразия древесных и кустарниковых растений в лесном хозяйстве // Лесохозяйственная информация. 2022. № 4. С. 58–84. DOI: 10.24419/hi.2304-3083.2022.4.07.
2. Рысин Л.П. Хвойные леса России // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, № 1 (4). С. 1106–1109.
3. Дегтярева А.П. Сосна обыкновенная в изменяющихся климатических условиях Центрального Черноземья // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. 2022. № 144. С. 14–18.
4. Селиховкин А.В., Поповичев Б.Г., Мандельштам М.Ю., Алексеев А.С. Роль стволовых вредителей в изменении состояния хвойных лесов на северо-западе европейской части России // Лесоведение. 2023. № 3. С. 304–321.
5. Румянцев Д.Е., Мельник П.Г. Влияние экологических факторов на формирование технических свойств древесины ели в условиях Тверской области // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2009. № 2. С. 28–34.
6. Стоноженко Л.В., Румянцев Д.Е., Найденова Е.В. Оценка реакции ели европейской на воздействие климатических факторов в древостоях разного породного состава // Лесохозяйственная информация. 2018. № 4. С. 21–30. DOI: 10.24419/hi.2304-3083.2018.4.03.
7. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович Л.А., Лутова А.Е. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. 2011. Т. 9, № 1. С. 32–43.
8. Мухина Ж.М., Дубина Е.В. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2011. № 66. С. 386–396.
9. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. 2018. Т. 10, № 1. С. 69–84.

10. Bachmann K. Molecular markers in plant ecology // New Phytologist. 1994. Vol. 126, iss. 3. P. 403–418. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04242.x.
11. Петюренко М.Ю., Камалова И.И., Сердюкова А.П. Экстракция суммарной ДНК из *Pinus sylvestris* L. при оценке полиморфизма – с использованием SSR- и RAPD-маркеров // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2021. № 3. С. 13–25.
12. Канукова К.Р., Газаев И.Х., Сабанчиева Л.К., Боготова З.И., Аппаев С.П. ДНК-маркеры в растениеводстве // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. 2019. № 6 (92). С. 220–232. DOI: 10.35330/1991-6639-2019-6-92-220-232.
13. Калько Г.В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2015. № 4. С. 19–34.
14. Шейкина О.В., Прохорова А.А., Новиков П.С., Криворотова Т.Н. Разработка методики идентификации клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной (*Picea abies* L.) с использованием ISSR маркеров // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2012. № 83. С. 56–69.
15. Прохорова А.А., Шейкина О.В., Гладков Ю.Ф. Генетическая изменчивость вегетативных потомств плюсовых деревьев ели на архиве клонов в Республике Марий Эл // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. 2013. № 2. С. 91–100.
16. Экарт А.К., Семеринов В.Л., Ларионова А.Я., Кравченко А.Н. Изменчивость локуса *mh44* митохондриальной ДНК в популяциях ели сибирской // Генетика. 2020. Т. 56, № 7. С. 842–847.
17. Потокина Е.К., Киселева А.А., Николаева М.А., Иванов С.А., Ульянич П.С., Потокин А.Ф. Использование маркеров оргanelльной ДНК для анализа филогенетики восточноевропейской популяции ели европейской *Picea abies* (L.) N. Karst // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 4–1. С. 818–830.
18. Падутов В.Е., Каган Д.И., Ивановская С.И., Баранов О.Ю., Маркевич Т.С. Геноегеография ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) по данным анализа цитоплазматической ДНК // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2021. Т. 65, № 4. С. 439–447. DOI: 10.29235/1561-8323-2021-65-4-439-447.
19. Падутов В.Е., Хотылева Л.В., Баранов О.Ю., Ивановская С.И. Генетические эффекты трансформации лесных экосистем // Экологическая генетика. 2008. Т. 6, № 1. С. 3–11.

Информация об авторе(-ах):	Information about the author(-s):
<p>Дегтярева Алина Петровна, младший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии; Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии (г. Воронеж, Российская Федерация). E-mail: ali.serdyukova@yandex.ru.</p>	<p>Degtyareva Alina Petrovna, junior researcher of Forest Genetics and Biotechnology Department; All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology (Voronezh, Russian Federation). E-mail: ali.serdyukova@yandex.ru.</p>

Для цитирования:

Дегтярева А.П. Об изученности молекулярных маркеров рода *Picea* в России и Беларуси // Самарский научный вестник. 2023. Т. 12, № 3. С. 36–39. DOI: 10.55355/snv2023123104.