

*На правах рукописи*



**ЧОХЕЛИ ВАСИЛИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ ДУБА  
ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR* L.) НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ  
ОБЛАСТИ**

*03.02.08 – экология (биологические науки)*

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2019

Работа выполнена в Ботаническом саду Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

- Научный руководитель:** **Вардуни Татьяна Викторовна**,  
доктор педагогических наук, кандидат биологических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»,  
Ботанический сад, директор
- Официальные оппоненты:** **Тохтарь Валерий Константинович**  
доктор биологических наук, с.н.с.,  
Научно-образовательный центр «Ботанический сад НИУ «БелГУ», директор
- Турчин Тарас Ярославович**  
доктор сельскохозяйственных наук, с.н.с.,  
ФГБУК «Государственный музей-заповедник М.А. Шолохова», заместитель директора по экологии и рациональному природопользованию
- Ведущая организация:** **ФГБУН Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН), г. Москва**

Защита диссертации состоится **12 апреля 2019 г. в 17:00** на заседании диссертационного совета Д 212.208.32 по биологическим наукам на базе Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к. 603.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю.А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Р. Зорге, 21Ж и на сайте <http://hub.sfedu.ru/diss/>.

Объявление о защите и текст автореферата размещен на официальном сайте Южного федерального университета [www.sfedu.ru](http://www.sfedu.ru) и на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru).

Отзывы на автореферат в 2-х экз., заверенные печатью, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к. 803а, ученому секретарю совета Д212.208.32 Акименко Ю.В. e-mail: [jvakimenko@sfedu.ru](mailto:jvakimenko@sfedu.ru).

Автореферат разослан «\_\_» февраля 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Акименко Юлия Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одной из важнейших задач популяционной экологии является изучение генетической структуры ценопопуляций на границах ареала. В степной зоне европейской части России такие исследования приоритетны для дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Создание здесь эффективных искусственных лесных насаждений должно быть основано на использовании генетически сходного и качественного посадочного материала. Внутри- и межпопуляционные взаимодействия играют ключевую роль в формировании устойчивости к экологическим факторам среды (Slatkin, 1987; Габитова, 2012).

*Q. robur* является ценным древесным видом, который может быть использован для создания многолетних насаждений в различных географических и климатических условиях, особенно в степной зоне юга России, обладающим продолжительным жизненным циклом (Wesolowski, Rowinski, 2008; Козловский и др., 2015).

На большей части ареала *Q. robur* достаточно детально исследована его популяционная структура (Ducouso, Bordacs, 2004; Каган, 2012; Карпеченко, 2014; Габитова, 2012). Однако на южной границе ареала *Q. robur* (где расположена 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.

**Цель и задачи исследования.** Цель исследований – эколого-генетический анализ ценопопуляционной структуры *Q. robur* на территории Ростовской области.

Для достижения цели решались следующие задачи:

1) Исследовать генетическое разнообразие ценопопуляций *Q. robur*, произрастающих в различных экологических условиях региона на основе ISSR-маркирования;

2) Оценить генетическую структуру Ростовской метапопуляции *Q. robur* с использованием RAPD-метода и осуществить ее сравнительный анализ с другими метапопуляциями в пределах ареала;

3) Оценить эффективность использования предложенных ISSR-праймеров для популяционного анализа и анализа филогенетических связей различных видов рода *Quercus* L., произрастающих в одинаковых природно-климатических условиях;

4) Провести генетический анализ фенологических форм *Q. robur*, находящихся в сходных экологических условиях с использованием предложенных ISSR-праймеров.

**Научная новизна.** Впервые с применением комплекса молекулярно-генетических маркеров (ISSR- и RAPD-анализ) была изучена популяционно-генетическая структура *Q. robur* на территории Ростовской области, показана информативность отобранных ISSR-праймеров для эколого-генетического анализа ценопопуляций. Получены дендрограммы родства видов (*Q. macrocarpa* Michx.; *Q. rubra* L.; *Q. libani* Oliv.; *Q. robur* L.; *Q. petraea* (Matt.) Liebl), согласующиеся с внутривидовой систематикой. Показано, что генетический анализ основанный на ISSR-анализе позволяет с большой надежностью проводить генетическую сертификацию уникальных и коллекционных образцов видов рода *Quercus*, выращенных в сходных экологических условиях. Впервые исследованы ценопопуляции *Q. robur* различных экотопов (байрачный, аренный, пойменный) на территории Ростовской области, и выявлены существенные различия между ними по уровню ожидаемой гетерозиготности. На основе RAPD-анализа установлено, что метапопуляция *Q. robur* Ростовской области занимает промежуточное положение по уровню генетического разнообразия в отношении ареала *Q. robur* между Центрально- и Западноевропейскими странами и Европейской частью России.

**Научно-практическая значимость работы.** Полученные данные о генетической структуре ценопопуляций *Q. robur*, основанные на использовании молекулярно-генетических маркеров, существенно дополняют картину внутри- и межпопуляционной изменчивости по целому ряду различных признаков, позволяют проследить динамику развития ценопопуляций *Q. robur* на границе его ареала.

На основе полученных результатов даны практические рекомендации по лесосеменному районированию территории Ростовской области, в том числе по разработке необходимых мер для адаптации *Q. robur* и повышения устойчивости дубрав к условиям среды; для организаций, работающих в сфере лесохозяйственной деятельности, что позволит получать качественный посадочный материал для создания искусственных лесонасаждений.

Полученные результаты будут использованы при реализации образовательных программ по направлению «Биология» в рамках преподавания дисциплин «Ботаника»,

"Генетика", "Популяционная генетика", "Экология", "Биология", "Лесное хозяйство" и др.

**Положения, выносимые на защиту.**

- 1) Ценопопуляции *Q. robur*, произрастающие в пойменных, аренных и байрачных экотопах Ростовской области, характеризуются различным средним уровнем ожидаемой гетерозиготности.
- 2) Популяционно-генетический анализ ценопопуляций *Q. robur* Ростовской области показал их принадлежность к дубовой формации центральной части ареала степной зоны Европейской части России.
- 3) Метапопуляция *Q. robur* Ростовской области (0,310) занимает промежуточное положение по уровню генетического разнообразия в отношении ареала *Q. robur* между метапопуляциями *Q. robur* Белорусского Полесья (0,345), центрально- и западноевропейских стран (0,391) и метапопуляцией *Q. robur* Европейской части России (0,250).
- 4) Найдены эффективные праймеры (ISSR и RAPD) для эколого-генетических исследований цено- и метапопуляций дуба черешчатого.

**Личный вклад соискателя.** Вклад соискателя состоит в сборе растительного материала, экспериментальной работе, анализе и интерпретации полученных результатов, в подготовке рукописей диссертации и автореферата. Подготовка публикаций по теме исследования осуществлена самостоятельно или при активном участии автора. Основные результаты исследований, представленные в диссертационной работе, получены в лаборатории клеточных и геномных технологий растений Ботанического сада Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации научно-исследовательской работы по теме «Разработка стратегии, методов и технологий сохранения и рационального использования биологического разнообразия в условиях природных и урбанизированных территорий степной зоны европейской части России» № 6.6222.2017/8.9. На основе данных диссертационного исследования зарегистрирована база данных «ISSR-анализ генетического разнообразия дуба черешчатого (*Quercus robur*) ООПТ РО» Свидетельство о государственной регистрации базы данных ОФЭРНиО № 23014 от 01.08.2017.

**Благодарности.** Автор благодарит научного руководителя д.п.н., профессора Т.В. Вардуни, сотрудников Ботанического сада ЮФУ: к.б.н. Б.Л. Козловского, с.н.с. А.Н. Шмараеву, к.б.н. Ж.Н. Шишлову, к.б.н. М.М. Середу, к.б.н. О.А. Капралову, к.б.н. В.В. Федяеву, Комитет по охране окружающей среды и природных ресурсов Ростовской

области в лице Т.Ю. Хибухиной, Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области в лице первого заместителя министра С.А. Парахина за помощь в организации полевых исследований, сотрудников лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси В.Е. Падутова, д.б.н., доцента О.Ю. Баранова, к.б.н. Д.И. Кагана за советы и консультации при проведении исследований и подготовке диссертации, а также сотрудников лаборатории молекулярной генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского ЮФУ в лице д.б.н., профессора А.В. Усатова, к.б.н., доцента Н.В. Маркина и м.н.с. М.С. Макаренко, декана лесохозяйственного факультета к.б.н. С.Н. Кружилину.

**Апробация работы.** Основные результаты были представлены и обсуждены на 7 международных конференциях: 6-ая международная конференция «Актуальные проблемы биологии, медицины и нанотехнологий» (г. Ростов-на-Дону, 2015 г.); II Международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие. Биоконсервация. Биомониторинг» (г. Майкоп, 2015 г.); Международная научная конференция и молодежная научная конференция памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова «Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии» (г. Ростов-на-Дону, 2016 г.); 5-ая Международная конференция-совещание «Сохранение лесных генетических ресурсов» (г. Гомель, 2017 г.); Международная научная конференция, посвященная 90-летию Ботанического сада ЮФУ «Современные технологии в изучении биоразнообразия и интродукции растений» (г. Ростов-на-Дону, 2017 г.); Научно-практическая конференция с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (г. Ростов-на-Дону, 2017 г.); XVII Международная конференция молодых ученых, посвященная 150-летию со дня рождения профессора Г.Ф. Морозова, 95-летию Казанского государственного аграрного университета и Году экологии в России «Леса Евразии – Леса Поволжья» (г. Казань – г. Москва, 2017 г.). Диссертация представлена на заседании Ростовского отделения Русского Ботанического Общества (РБО) (г. Ростов-на-Дону, 2018 г.).

**Публикации.** По теме исследования опубликовано 11 работ, среди которых 4 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК (в том числе в изданиях индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus) 1 РИД и 7 тезисов, представленных на различных международных конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: «Введение», «Глава 1. Обзор литературы», «Глава 2. Объект исследования», «Глава 3. Методы

исследования», «Глава 4. Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список использованных источников», «Приложения». Работа содержит 15 рисунков и 17 таблиц, список литературы включает 188 источников, в т.ч. 64 – на иностранных языках.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В данной главе автором приведена общая биологическая характеристика вида *Quercus robur* L. Проведен анализ отечественных и зарубежных работ по изучению популяционной структуры древесных видов растений с применением молекулярно-генетических маркеров. Описан климат Ростовской области, дана краткая характеристика по почвенным условиям, геоморфологии и геологии, гидрографии и растительности Ростовской области.

### **Глава 2. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектом исследования послужили деревья *Q. robur* L. из различных мест произрастания. Отобранные ценопопуляции локализовались в естественном ареале *Q. robur* на территории Ростовской области (рис. 1). В каждой ценопопуляции было отобрано по 20 деревьев, расположенных не менее 10 метров друг от друга. Всего было проанализировано 260 образцов *Q. robur*, принадлежащих к 13-ти ценопопуляциям, объединенным в метапопуляцию Ростовской области.

Изученные ценопопуляции систематизировали по различным экологическим условиям произрастания (экотопам) (Зозулин, 1992; Турчин и Коробова, 2014; Постановление Администрации..., 2006). 13 ценопопуляций произрастали в трёх экотопах:

**А. Байрачные леса.** Древесные насаждения, которые произрастают только по склонам балок (байраков). К данной группе относятся: Песковатско-Лопатинский лес (ПЛ), Урочище «Филькино» (Ф), Урочище «Липяги» (Л), Раздорские склоны (Рс), Крыйдянный лес (Кр), Ореховая балка (Ор), Черная балка (Чб), Урочище «Веденеево» (В).

**Б. Аренные леса.** Древостои, находящиеся на аренах (песчаных массивах). К данной группе были отнесены: Кундрюченские пески (Кп), Чернышевские пески (Чп) - искусств., Степные колки (Ск).

**В. Пойменные леса.** Ценопопуляции – расположенная в пойме реки: Урочище «Хоботок» (Х), Куйбышевский лес (К) - искусств.

Поскольку в Ростовской области дубовые насаждения сохранились в основном на территории особо охраняемой природной территории (ООПТ), каждая ценопопуляция была ассоциирована с соответствующим участком ООПТ.

В таблице 1 дана краткая характеристика 13 ценопопуляций, которые объединены в 3 экотопа.

Для оценки генетического сходства фенологических форм, произрастающих в сходных экологических условиях (территория Ботанического сада ЮФУ), отобраны образцы, относящиеся к различным видам рода *Quercus* L.

Из искусственной ценопопуляции Ботанического сада ЮФУ были отобраны и описаны (Козловский и др., 2015) образцы, соответствующие по фенологическому циклу *Q. robur* var. *tardiflora* (зимняя форма) - № 1 – 1888 года посадки, № 2 – 1975 г. посадки, а также семенное поколение от № 1 и образцы *Q. robur* var. *praesox* (летняя форма) из трех разных генераций: № 1 и № 2 1930 года посадки из парковых насаждений ботанического сада, № 3 1963 года посадки – из насаждений коллекции орехоплодных растений, № 4 и № 5 1975 года посадки – из насаждений дендрария. Для филогенетического анализа и анализа фенологических форм была отобрана также пирамидальная форма *Q. robur*, полученная из семян *Q. robur* 'Fastigiata'.

Для предварительного определения положения отобранных форм в филогенетическом древе рода *Quercus* были отобраны образцы других видов разной степени родства с *Q. robur* L. В качестве наиболее филогенетически близкого вида отобраны образцы *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (Россия, Республика Адыгея, база практики «Белая речка»). В качестве филогенетически далеких видов из коллекции Ботанического сада ЮФУ отобраны образцы следующих видов: *Q. libani* Oliv., *Q. macrocarpa* Michx., *Q. rubra* L (Chokheli et al., 2016).

### **Глава 3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1 Выделение ДНК**

Экстракцию ДНК проводили из листьев дуба черешчатого, которые предварительно были продезинфицированы и обработаны детергентом TWIN-80. Выделение ДНК осуществляли сорбентным методом с использованием коммерческого набора "Сорб-ГМО-Б" (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для ISSR- и RAPD-анализа использовали двойную очистку. После выделения по протоколу производили дополнительную очистку ранее полученной ДНК, используя половинные объемы реактивов и минуя стадию лизиса клеток в термостате





Рисунок 1. Места отбора образцов *Q. robur* на территории Ростовской области

Байрачные леса (красным цветом): Кр - Крыйдянный лес, Пл - Песковатско-Лопатинский лес, Рс - Раздорские склоны, Ф - Урочище «Филькино», В - Урочище «Веденево», Л - Урочище «Липяги», Ор - Ореховая балка, Чб - Черная балка; Аренные (желтым) Ск - Степные колки, Кп - Кундрюченские пески, Чп - Чернышевские пески; Пойменные (оранжевым) Х - Урочище «Хоботок», К - Куйбышевский лес

Таблица 1

Сравнение основных характеристик (биотических и абиотических) для 13 ценопопуляций дуба черешчатого.

		<b>Рельеф</b>	<b>Климат</b>	<b>Почва</b>	<b>Гидрологические условия</b>	<b>Растительность</b>
<b>Байрачные экотопы</b>	<b>Рс</b>	Рельеф – долинно-балочный, представлен водораздельной равниной, пересеченной балками, круто обрывающимися к пойме Дона с перепадом высот 120–180 м	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,62-0,7; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 3000-3200 °С. Средняя температура июля +22 °С, января -7 °С. ГТК равен 0,62-0,7	Черноземы обыкновенные и южные	Постоянные и временные водотоки на днищах балок, питающиеся ключами, выходящими из пластов песка и известняка	Фрагменты формаций байрачных дубрав (субформация простых дубрав) и берестняков
	<b>Кр</b>	Пониженный участок юго-восточной части Средне-Русской возвышенности с высотами 170–200 м над у. м.	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,7-0,8; количество осадков около 400 мм; сумма активных температур 2700-3000 °С. Средняя температура июля +21-22 °С, января -8-9 °С	Черноземы южные	Правобережная часть долины р. Калитвы. Система балок. Временные водотоки по днищам балок	Фрагмент формации байрачных дубрав (субформация упрощенных дубрав)
	<b>Ор</b>	Центральная часть Доно-Донецкой впадины. Денудационная равнина на моноклиналиных	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,7-0,8; количество осадков	Черноземы обыкновенные и южные	Система балок с временными водотоками и долина р. Ольховой. Бассейн р. Калитвы	Фрагменты субформации сложных дубрав. Основную площадь занимают фрагменты субформации простых

	структурах Воронежской антеклизы (Донская гряда).	около 440 мм; сумма активных температур 2800-3000 °С. Средняя температура июля +21-22 °С, января -8-9 °С.			дубрав с участием ясеня обыкновенного, клена полевого, клена татарского и др.
<b>Чб</b>	Донецкая возвышенная равнина на складчатых структурах Донецкого выступа.	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент (ГКТ) составляет 0,62-0,7; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 3000-3200 °С. Средняя температура июля +22 °С, января -7 °С	Черноземы южные	Река Северский Донец	Господствующую роль в байрачном лесу играют дуб черешчатый, которому сопутствуют ясень высокий, клен полевой, вяз полевой
<b>В</b>	Денудационная равнина на моноклиальных структурах Воронежской антеклизы.	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,7-0,8; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 2800-3000 °С. Средняя температура июля +21-22 °С, января -8-9 °С	Черноземы южные	Верховья правого притока Дона р. Тихой	Фрагмент формации байрачных дубрав (субформация упрощенных дубрав). Естественный лес – дубрава пестроперловниковая с участием ясеня обыкновенного, клена полевого, клена татарского и др.
<b>ПЛ</b>	Юго-западные отроги Калачской возвышенности Среднерусской пласово-денудационной возвышенной равнины.	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,7-0,8; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 2800-3000 °С. Средняя температура июля +21-	Черноземы южные	На территории располагается несколько родников	Лес - сложная дубрава со значительным участием, кленов остролистного, полевого, татарского, ясеня обыкновенного, липы мелколистной, осины, яблони и груши

			22 °С, января -8-9 °С			
	<b>Ф</b>	Расположен на Донецкой возвышенной равнине - на складчатых структурах Донецкого выступа.	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет здесь 0,62-0,7; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 3000-3200 °С. Среднемесячная температура зимой – 8,2 °С, летом +22,2 °С	Черноземы южные	Бассейн р. Березовой (приток р. Калитвы). Родник в верховьях балки, водоток подпружен	Естественный лес сосредоточен в многочисленных отвершках, впадающих в балку с севера. В облесенных частях отвершков лес образует сплошные сомкнутые массивы
	<b>Л</b>	Возвышенность, района Доно-Донецкой эрозионной равнины на моноклиальных структурах Воронежской антеклизы и Преддонецкого прогиба	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0.7-0.8; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 2800-3000 °С. Средняя температура июля +21-22 °С, января -8-9 °С,	Черноземы обыкновенные и южные	Бассейн р. Калитвы. В центре урочища расположены два родниковых пруда	В лесонасаждении преобладающие породы: сосна обыкновенная, дуб черешчатый, ясень зеленый
<b>Аренные экотопы</b>	<b>Чп</b>	В геоморфологическом отношении расположен на Доно-Чирской равнине	Умеренно засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,62-0,7; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 3000-3200 °С. Средняя температура июля +22 °С, января -7 °С	Пески средне гумусированные	Расположена на левобережной террасе долины р. Чир	Посадки сосны обыкновенной и крымской с 1906 по 1939 годы. В подлеске местами имеется подрост вяза полевого и дуба черешчатого, из кустарников отмечена бузина черная и смородина золотистая
	<b>Ск</b>	Волнисто-холмистые пологие и покатые	Засушливый, недостаточно жаркий.	Пески слабо- и средне	Постоянный водоток по дну балки. В	На территории разбросаны дубовые,

		склоны	Гидротермический коэффициент составляет 0,66-0,72; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 3000-3200 °С. Средняя температура июля +22 °С, января 6-8 °С	гумусированные	северной части расположен родник, обустроен	осиновые, ольховые, шелюговые колки
	<b>Кп</b>	Пойменная слегка возвышенная территория междуречья. Большой песчаный массив. Имеются понижения с произрастанием в них березовых и осиновых колок	Климат умеренно-континентальный, средние температуры: января -6,3 °С, июля +23,4 °С; среднегодовое количество осадков – 550 мм. Сумма активных температур – 3200 °С.	Пески серые гумусированные	Расположен в междуречье рек Северский Донец и Кундрючья	Песчаный массив с аренными лесами, включающими посадки сосны, естественные дубравы, ольшаники, березняки с псаммофитной травянистой растительностью
<b>Пойменные экотопы</b>	<b>Х</b>	Возвышенная равнина, представлена отдельными возвышениями и расположенными между ними ложбинами	Засушливый, недостаточно жаркий. Гидротермический коэффициент составляет 0,66-0,72; количество осадков около 440 мм; сумма активных температур 3000-3200 °С. Средняя температура июля +22 °С, января 6-8 °С	Почвы аллювиальные	Река Северский Донец.	Основой пойменного леса является дуб черешчатый, к нему примешиваются клены явор и полевой, вяз мелколистный, тополя черный, белый и канадский.
	<b>К</b>	Низменная денудационно-аккумулятивная наклонная равнина	Умеренно континентальный умеренно жаркий и умеренно засушливый степной тип. Коэффициент увлажнения: 0,46	Почвы аллювиальные лугово-черноземные	Левобережная часть поймы р. Миус	Искусственные посадки дуба черешчатого, проведенные в 1926 г. Древостой состоит из дуба черешчатого с примесью ясеня

			Осадки: 422 мм Температура: свыше 10 °С Солнечная радиация: 4550-4700 МДж/м <sup>2</sup> (111-113 ккал/см <sup>2</sup> )			обыкновенного
--	--	--	--	--	--	---------------

Байрачные: Кр - Крыдьянный лес, Пл - Песковатско-Лопатинский лес, Рс - Раздорские склоны, Ф - Урочище «Филькино», В - Урочище «Веденеево», Л - Урочище «Липяги», Ор - Ореховая балка, Чб - Черная балка; Аренные: Ск - Степные колки, Кп - Кундрюченские пески, Чп - Чернышевские пески; Пойменные: Х - Урочище «Хоботок», К - Куйбышевский лес

### **3.2 Определение концентрации ДНК**

Концентрацию ДНК определяли по стандартным методикам в соответствии с протоколом производителя на анализаторе Qubit 3.0 (Invitrogen, США), с некоторыми модификациями.

### **3.3 ISSR-анализ. ПЦР**

ISSR-праймеры подбирали опытным путем. ПЦР-смесь готовили из расчёта на один образец: H<sub>2</sub>O (DD) – 15,8 мкл, 25 мМ раствор нуклеотидов 10×dNTP – 2,5 мкл, 10×буфер для ПЦР – 2,5 мкл, 25 мМ хлорид магния (MgCl<sub>2</sub>) – 2,5 мкл, мутантная Taq-полимераза – 0,2 мкл (5 ед./мкл), ДНК-матрица (концентрация 5 нг/мкл) – 1 мкл, праймер (30 пМ/мкл) – 0,5 мкл. Общий объём ПЦР-смеси – 25 мкл. Амплификация проводилась в термоциклере T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, США). Протокол амплификации: 1. 94 °C – 1:00 мин.; 2. 94 °C – 0:30 с; 3. T<sub>a</sub> °C – 0:45 с; 4. 72 °C – 2:00 мин.; 5. 35 циклов пункты 2-4; 6. 72 °C – 5:00 мин.; 7. Хранение при 4 °C.

### **3.4 RAPD-анализ. ПЦР**

RAPD-праймеры подбирали опытным путем. ПЦР-смесь готовили из расчёта на один образец: H<sub>2</sub>O (DD) – 8 мкл; раствор 10×dNTP – 2,5 мкл (производство Литех); 10×TaqTurboBufer – 2,5 мкл; MgCl<sub>2</sub> (25 мМ) – 2,5 мкл; HS Taq-полимераза (5 ед./мкл) – 0,5 мкл; ДНК-матрица (концентрация 5 нг/мкл) – 5 мкл, праймер (10 пМ/мкл) – 4 мкл. Общий объём ПЦР-смеси – 25 мкл. Амплификация проводилась в термоциклере T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, США). Протокол амплификации: 1. 95 °C – 3:00 мин.; 2. 95 °C – 0:20 с; 3. T<sub>a</sub> °C – 0:20 с; 4. 72 °C – 0:20 с; 5. 34 цикла пункты 2-4; 6. 72 °C – 10:00 мин.; 7. Хранение при 4 °C.

### **3.5 Электрофорез в агарозном геле**

Разделение фрагментов проводили электрофорезом в 2 %-м агарозном геле с использованием 1×TBE-буфера (Tris, Boric acid, EDTA) на мощности 90 В, 3 часа, источник питания – Power Pac Basic (BIO-RAD, США). Окрашивание ДНК производили красителем SYBR Green I x80 (Lumiprobe, США) из соотношения 2 мкл красителя на 5 мкл ампликонов, съёмку – в гелъдокументирующей системе GelDoc XR+ (BIO-RAD, США) с программным обеспечением Image Lab версии 6.0 (BIO-RAD, США). Маркер длин ДНК фрагментов 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия) добавляли по 7 мкл в лунку.

### **3.6 Статистический анализ**

Компьютерную обработку полученных фореграмм проводили при помощи программы PyErf 1.4, с последующим представлением в виде матрицы бинарных данных. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты, изменчивость по интенсивности не учитывалась. Иерархический

кластерный анализ данных проводился методами Neighbor-Joining (NJ) и Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Nei, Li, 1979) с использованием программ TREECON (version 1.3b) и PyElph 1.4 (Van De Peer, De Watcher, 1994). По матрице состояний с помощью компьютерной программы Winboot (Yap, Nelson 1996) была составлена матрица сходства и генетической дистанции с использованием коэффициента Жаккарда. Компьютерный анализ полиморфизма ДНК проведен с помощью программы POPGENE 1.32.

## Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Определение характера изменчивости ДНК-маркеров в ценопопуляциях дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) различных мест произрастания на основе ISSR-анализа

Популяционно-генетический анализ лесобразующих древесных растений необходим для разработки научных основ селекционных исследований, связанных с изучением и поддержанием генетического потенциала видов (Путенихин, Фарушкина, 2007; Каган, 2012).

На основании анализа полученных электрофореграмм была построена таблица 2.

Таблица 2

Анализ информативности праймеров по 13 ценопопуляциям *Q. robur*

Название ISSR-праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, (°C)	Длина фрагментов, п.н.	Число фрагментов на общую выборку
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	53	225-1250	40
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	52	250-1600	45
UBC 841	(GA) <sub>8</sub> YC	52	375-1650	47
UBC 857	(AC) <sub>8</sub> YG	52	200-1550	45
UBC 880	(GGAG) <sub>4</sub>	53	225-1650	49
Итого				226

Для изученных ценопопуляций *Q. robur* были рассчитаны основные показатели генетической изменчивости. Распределение ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) в среднем по всем ценопопуляциям составило 0,3848, где минимальная ожидаемая гетерозиготность установлена для ценопопуляции Кп ( $H_e = 0,1627$ ), а максимальная – для ценопопуляции Л ( $H_e = 0,3485$ ).



На основе полученных данных (табл. 3) можно сделать вывод, что общее генетическое разнообразие в общей выборке среди всех популяций составляет 24%, среднее внутривидовое генетическое разнообразие по всем локусам составляет 0,1319. Показатель подразделенности исследованных нами 13 ценопопуляций составляет 1% ( $G_{ST} = 1,0055$ ). Для центральной части ареала древесного вида характерна слабая дифференциация ( $G_{ST} = 2-6\%$ ), которая возрастает до 8–10% при включении краевых популяций, обычно изолированных от основного ареала (Алтухов и др., 2004). Из этого следует, что исследованные 13 ценопопуляций слабо дифференцированы друг от друга, и, по-видимому, могут быть отнесены к дубовой формации центральной части ареала степной зоны Европейской части России.

Таблица 3

Генетическая структура 13 ценопопуляций *Q. robur* в Ростовской области  
(G-статистика Неи)

	$H_T (\bar{x} \pm \sigma)$	$H_S (\bar{x} \pm \sigma)$	$G_{ST}$	Nm
<b>На общую выборку</b>	24,1219±2287,6625	0,1319±0,0087	1,0055	0,0027

\*  $H_T$  – общее генетическое разнообразие в суммарной выборке

\*  $H_S$  – среднее внутривидовое генетическое разнообразие

\*  $G_{ST}$  – доля межпопуляционного разнообразия

\* Nm – оценка генного потока от  $G_{ST}$

Генный поток (Nm) находится на уровне 1%, т.е. в каждой из исследованных ценопопуляций дуба черешчатого в среднем одно дерево имеет геномы, привнесенные из соседних популяций.

На основании рассчитанных значений коэффициентов генетической дистанции Неи, посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA), была построена дендрограмма для исследованных насаждений *Q. robur* (рис. 2).

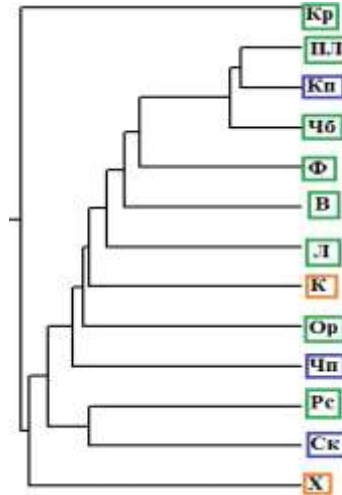


Рисунок 2 – Дендрограмма степени генетической дифференциации ценопопуляций *Q. robur* на территории Ростовской области

Кр - Крыйдянный лес, Пл - Песковатско-Лопатинский лес, Рс - Раздорские склоны, Ф - Урочище «Филькино», Чп - Чернышевские пески, В - Урочище «Веденево», К - Куйбышевский лес, Кп - Кундрюченские пески, Л - Урочище «Липяги», Ор - Ореховая балка, Ск - Степные колки, Х - Урочище «Хоботок», Чб - Черная балка

Исходя из классификации экотопов ценопопуляций дуба черешчатого, на данной дендрограмме зеленым цветом обозначены байрачные экотопы (Кр, Ор, Рс, Чб, В, Пл, Ф, Л), синим цветом обозначены аренные экотопы (Кп, Чп, Ск), оранжевым цветом обозначен пойменные экотопы (К, Х).

При использовании иерархического кластерного анализа на основе генетических дистанций Неи-формирования самостоятельных кластеров для различных экотопов не происходит. Однако, наряду с этим, прослеживается закономерность в построении узлов, обусловленная слабой дифференциацией изученных ценопопуляций относительно друг друга ( $G_{ST} = 1,0055$ ) и сходным средним уровнем ожидаемой гетерозиготности в аренном и пойменном экотопах (рис. 5). Характер распределения на дендрограмме искусственных ценопопуляций объясняется использованием при их создании генетического материала из байрачных и аренных экотопов *Q. robur*.

На основе данных об уровне генетической изменчивости были построены диаграммы, отражающие значения ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) для 13 ценопопуляций (рис. 3) и средние значения для каждой группы экотопов (рис. 4).

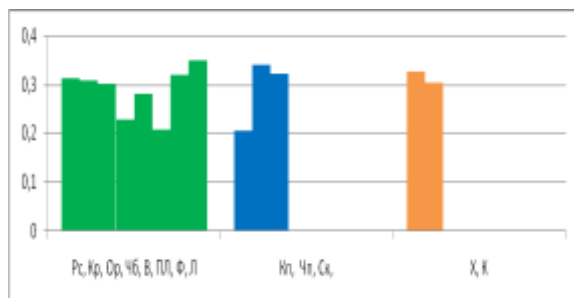


Рисунок 3 – Диаграмма среднего уровня ожидаемой гетерозиготности в 13 ценопопуляциях *Q. robur* на территории Ростовской области



Рисунок 4 – Диаграмма среднего уровня ожидаемой гетерозиготности в изученных экотопах *Q. robur* на территории Ростовской области

Большинство изученных ценопопуляций одного экотопа характеризовались сходным уровнем ожидаемой гетерозиготности, за исключением некоторых ценопопуляций байрачного экотопа (ценопопуляции ЧБ и ПЛ показали низкий уровень ожидаемой гетерозиготности) и аренного экотопа (ценопопуляция Кп показала низкий уровень ожидаемой гетерозиготности) (рис. 3).

На рисунке 4 показано, что все экотопы характеризуются достоверными различиями (по t-критерию Стьюдента при уровне значимости 0,05). Так, среди природных ценопопуляций дуба черешчатого наивысшим средним уровнем ожидаемой гетерозиготности обладает пойменный экотоп ( $0,3140 \pm 0,1585$ ), а наименьшим – байрачный ( $0,2965 \pm 0,1461$ ). Таким образом, на примере ценопопуляций *Q. robur* Ростовской области показано, что в ряду экотопов «пойменный → аренный → байрачный» наблюдается взаимосвязь между величиной показателя средней ожидаемой гетерозиготности и особенностями почвенного гидрологического режима.

Пойменные экотопы характеризуются более оптимальными условиями для произрастания дуба черешчатого, что проявляется в сохранении большего разнообразия генотипов. В то же время в байрачных экотопах на ранних этапах формирования древостоев происходит элиминация гетерозигот с сохранением гомозигот, по-видимому, более приспособленных к этим условиям. Однако, гомозиготы по различным альтернативным вариантам обладают адаптивным характером, что приводит к явно выраженному отсутствию кластеризации на дендрограмме.

#### 4.2 Генетическая структура Ростовской метапопуляции *Quercus robur* L на основе RAPD-анализа

В ходе предварительного генетического анализа выделено пять наиболее эффективных олигонуклеотидных RAPD-праймеров: Oligo 4, Oligo 16, Oligo 28, Oligo 31, Oligo 32 (Чохели и др., 2017 Б).

Для изученной метапопуляции *Q. robur*, включающей 13 ценопопуляций, были выявлены основные показатели генетической изменчивости (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительная характеристика параметров генетического разнообразия насаждений *Q. robur* в России, Беларуси и странах Центральной и Западной Европы на основе RAPD-анализа

Показатель	Европейская часть России	Ростовская область	Белорусское Полесье	Центральная и Западная Европа
Среднее число аллелей на локус	2,000	2,000	2,000	2,000
Эффективное число аллелей ( $n_e$ )	1,399	1,520	1,580	1,691
Ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ )	0,250	0,310	0,345	0,391

Установлено, что эффективное число аллелей для проанализированной Ростовской метапопуляции *Q. robur* составило 1,520. Это выше, чем для дубовых насаждений Европейской части России (1,399), и несколько ниже, чем для насаждений Белорусского Полесья (1,580) и Центральной и Западной Европы (1,691). Значение ожидаемой гетерозиготности (0,310) в метапопуляции *Q. robur* степной зоны Европейской части России, где расположена Ростовская область, несколько ниже, чем в метапопуляциях *Q. robur* Белорусского Полесья (0,345) (Каган, 2012) и центрально- и западноевропейских стран (0,391) (Vodenes et al., 1997), и превышает значения  $H_e$ , установленные для популяций Европейской части России (0,250) (Яковлев, Клейншмит, 2002).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что степная зона Европейской части России, где расположена Ростовская область, занимает промежуточное положение по уровню генетического разнообразия в отношении ареала *Q. robur*.

Уровень ожидаемой гетерозиготности по сравнению с другими центрами происхождения, является оптимумом для метапопуляции центрально- и западноевропейских стран. Пессимумом являются окраины ареала. Так для метапопуляции Ростовской области, находящейся в пессимуме, показан более высокий (по сравнению с северной границей ареала, где расположена Европейская часть России) адаптивный потенциал к изменяющимся условиям окружающей среды.

Так в случае появления оптимальных условий произрастания дуба черешчатого на юге, Ростовская метапопуляция может служить основой для расширения ареала.

#### 4.3 Филогенетические взаимоотношения в роде Дуб (*Quercus*)

Из двадцати использованных ISSR-праймеров выделено пять наиболее эффективных для генетического анализа: UBC 811 ((GA)<sub>8</sub>C), UBC 835 ((AG)<sub>8</sub>YC), UBC 841 ((GA)<sub>8</sub>YC), UBC 857 ((AC)<sub>8</sub>YG), UBC 880 ((GGAG)<sub>4</sub>).

На основе полученных результатов различными методами кластеризации были построены дендрограммы генетического сходства исследуемых образцов по каждому из праймеров. На основании полученных результатов показано, что отобранные пять олигонуклеотидных ISSR-праймеров могут быть использованы для последующего исследования популяционно-генетического разнообразия *Q. robur*.

#### 4.4 Генетический анализ фенологических форм *Quercus robur* L.

С целью определения уровня генетической дифференциации материнского растения и семенного поколения на основании выбранных нами праймеров было изучено семенное потомство позднораспускающейся формы *Q. robur*.

В результате исследований показано, что генетический анализ с использованием изученных ISSR-праймеров может с высокой надежностью использоваться для генетической паспортизации уникальных и коллекционных образцов видов рода *Quercus*, однако не позволяет эффективно дифференцировать фенологические формы *Q. robur*, произрастающие в сходных экологических условиях.

### ВЫВОДЫ

1. Среди природных ценопопуляций дуба черешчатого наивысшим средним уровнем ожидаемой гетерозиготности обладает пойменный экотоп ( $0,3140 \pm 0,1585$ ), а наименьшим – байрачный ( $0,2965 \pm 0,1461$ ). Наблюдается закономерность в уменьшении уровня ожидаемой гетерозиготности для более «засушливых» экотопов. Наиболее оптимальные условия произрастания дуба черешчатого наблюдаются в пойменных экотопах, где сохраняется большое разнообразие генотипов.

2. Исследованные ценопопуляции *Q. robur* в Ростовской области характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости, что указывает на их высокий адаптивный потенциал. Так, абсолютное число аллелей ( $n_a$ ) варьирует от 1,3929 до 1,9917. Эффективное число аллелей ( $n_e$ ) укладывается в диапазон от 1,2778 до 1,5996. Распределение ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) в среднем по всем ценопопуляциям составило 0,3848, где минимальное значение показателя равно 0,1627, а максимальное – 0,3485.

3. Исследованные ценопопуляции дуба черешчатого слабо дифференцированы относительно друг друга (показатель подразделенности составляет 1% ( $G_{ST} = 1,0055$ ) и

могут быть отнесены к дубовой формации центральной части ареала степной зоны Европейской части России.

4. Ростовская метапопуляция, расположенная в степной зоне Европейской части России, занимает промежуточное положение по уровню генетического разнообразия в отношении ареала *Q. robur*. Значение ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ), полученное на основе RAPD-анализа, в метапопуляции *Q. robur* степной зоны Европейской части России (0,310) несколько ниже, чем в метапопуляциях *Q. robur* Белорусского Полесья (0,345) и центрально- и западноевропейских стран (0,391), и превышает таковое, установленное на территории Европейской части России (0,250).

5. Ростовская метапопуляция (южная граница ареала, зона пессимума, пессимальные условия) характеризуется более высоким адаптивным потенциалом по сравнению с метапопуляцией Европейской части России (северная граница ареала, зона пессимума), и может служить основой для расширения ареала дуба черешчатого.

6. В результате проведенных исследований из двадцати использованных ISSR-праймеров выделено пять наиболее эффективных для генетического анализа: UBC 811 ((GA)<sub>8</sub>C), UBC 835 ((AG)<sub>8</sub>YC), UBC 841 ((GA)<sub>8</sub>YC), UBC 857 ((AC)<sub>8</sub>YG), UBC 880 ((GGAG)<sub>4</sub>). Полученные дендрограммы филогенетических отношений видов рода *Quercus* соответствуют внутривидовой систематике изученных видов. Также было выделено пять наиболее эффективных олигонуклеотидных RAPD-праймеров: Oligo 4 (CAAACGGCAC), Oligo 16 (GCCCCCTCGTC), Oligo 28 (GTTTTCGCTCC), Oligo 31 (CCCGTCAGCA), Oligo 32 (CCGCAGCCAA). Указанные праймеры эффективны для эколого-генетических исследований цено- и метапопуляций дуба черешчатого.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК (в том числе в изданиях индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus)

1. Chokheli Vasilii, Kozlovsky Boris, Sereda Mikhail, Lysenko Vladimir, Fesenko Igor, Varduny Tatiana, Kapralova Olga, Bondarenko Elena. Preliminary Comparative Analysis of Phenological Varieties of *Quercus robur* by ISSR-Markers // Journal of Botany, vol. 2016, Article ID 7910451, 7 pages, 2016. doi:10.1155/2016/7910451.
2. Chokheli Vasily, Kagan Dmitry, Rajput Vishnu, Kozlovsky Boris, Sereda Mikhail, Shmaraeva Antonina, Khibuhina Tatiana, Fedyeva Valentina, Shishlova Zhanna, Dmitriev Pavel, Varduny Tatiana, Kapralova Olga, Usatov Alexandr. The study of genetic variability of cenopopulations of pedunculate oak (*Quercus robur*) in the Rostov region with the use of ISSR-markers // International Journal of Agriculture and Biology, vol. 20, No 11, 2018, p. 2544-2548, DOI: 10.17957/IJAB/15.0802.

3. Чохели В.А., Козловский Б.Л., Серeda М.М., Вардуни Т.В. Результаты изучения фенологических форм *Quercus robur* L. с помощью ISSR-маркеров // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки, 2016 год, № 2(190), 72-77. УДК 575.22:582.632.2, DOI 10.18522/0321-3005-2016-2-72-77.
4. Чохели В.А., Каган Д.И., Вардуни Т.В., Козловский Б.Л., Серeda 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, Т. 21, № 4, с. 161–167.

#### РИД

5. ISSR-анализ генетического разнообразия дуба черешчатого (*Quercus robur*) ООПТ РО» Свидетельство о государственной регистрации базы данных ОФЭРНиО № 23014 от 01.08.2017.

#### Публикации в других изданиях

6. Чохели В.А., Вардуни Т.В., Козловский Б.Л., Серeda М.М., Капралова О.А. Генетический анализ образцов рода *Quercus* L. в искусственной популяции Ботанического сада ЮФУ. // В сб. трудов 6 международной конференции «Актуальные проблемы биологии, медицины и нанотехнологий», г. Ростов-на-Дону, 2015 г., с. 293-295.
7. В.А. Чохели, Б.Л. Козловский, М.М. Серeda, Т.В. Вардуни. Анализ генетической изменчивости образцов *Quercus robur* L. из искусственной популяции Ботанического сада ЮФУ // Сборник материалов II Международной научно-практической конференции «Биоразнообразие. Биоконсервация. Биомониторинг», г. Майкоп, 2015 г., с. 130-133.
8. Чохели В.А., Козловский Б.Л., Вардуни Т.В., Серeda М.М. Генетический анализ фенологических форм *Quercus robur* L. из искусственной популяции Ботанического сада ЮФУ. // В сборнике: Окружающая среда и человек. Современные проблемы генетики, селекции и биотехнологии материалы международной научной конференции и молодежной научной конференции памяти члена-корреспондента РАН Д.Г. Матишова. г. Ростов-на-Дону, 2016г., с. 570-572. ISBN 978-5-4358-0136-1.
9. Чохели В.А., Усатов А.В., Маркин Н.В., Каган Д.И., Падутов В.Е., Макаренко М.С., Вардуни Т.В. Оптимизация RAPD-анализа для дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), произрастающего на территории Ростовской области // 5 Международная конференция-совещание «Сохранение лесных генетических ресурсов», г. Гомель, 2017 г., с. 239-240.

10. Чохели В.А., Козловский Б.Л., Серeda М.М., Вардуни Т.В., Капралова О.А., Дмитриев П.А. Генетическая дифференциация фенологических форм дуба черешчатого в Ростовской области // Международная научная конференция, посвященная 90-летию Ботанического сада ЮФУ «Современные технологии в изучении биоразнообразия и интродукции растений», г. Ростов-на-Дону, 2017 г., с. 93-95.
11. Чохели В.А., Козловский Б.Л., Серeda М.М., Вардуни Т.В., Каган Д.И., Падутов В.Е. Использование ISSR-метода для изучения межвидовой изменчивости рода Дуб на территории Ботанического сада ЮФУ // XVII Международная конференция молодых ученых, посвященной 150-летию со дня рождения профессора Г.Ф. Морозова, 95-летию Казанского государственного аграрного университета и Году экологии в России «Леса Евразии – леса Поволжья», г. Казань-Москва, 2017 г., с. 163-165.

#### **СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ**

ISSR – inter-simple sequence repeats

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

RAPD – random amplified polymorphic DNA