

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *TULIPA SUAVEOLENS* ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-88-93

УДК 575.174.015.3

Поступление/Received: 21.03.2019

Принято/Accepted: 29.11.2019

Т. А. КРИЦКАЯ, А. С. КАШИН

Саратовский национальный исследовательский
государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012 Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83;
✉ kritckaiata@gmail.com

GENETIC DIVERSITY OF *TULIPA SUAVEOLENS* ROTH
POPULATIONS IN VOLGOGRAD PROVINCE

T. A. KRITSKAYA, A. S. KASHIN

Saratov State University,
83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia;
✉ kritckaiata@gmail.com

Актуальность. Современный естественный ареал *Tulipa suaveolens* Roth стремительно сокращается. Для выбора стратегии сохранения этого вида необходима оценка внутри- и межпопуляционного полиморфизма. **Материалы и методы.** Для анализа 125 образцов 10 популяций *T. suaveolens* Волгоградской области и 4 популяций Саратовской области были выбраны молекулярно-генетические ISSR-маркеры. **Результаты.** ISSR-анализ позволил выявить высокий уровень полиморфизма (73–89%) внутри популяций *T. suaveolens* Волгоградской области. По результатам AMOVA, большая часть изменчивости (74,3%) приходится на внутривидовой полиморфизм. Доля изменчивости, которая приходится на межпопуляционные различия, составила 25,7%. Общая подразделенность популяций (F_{ST}) равна 0,257. Общий поток генов (Nm) между популяциями – 0,723. Согласно результатам байесовского анализа и кластеризации двумя различными методами (UPGMA и Neighbor Joining), все исследованные особи *T. suaveolens* Волгоградской области образуют одну большую генетическую группу, в которой ни одна из потенциальных подгрупп не может быть ассоциирована с тем или иным районом сбора образцов. Результаты, полученные в программе NewHybrids, указывают на гибридную природу большей части особей. Отдельную генетическую группу составили образцы трех популяций Саратовской области, которые были отнесены в категорию родительской формы. **Заключение.** Учитывая то, что в пределах административных границ Волгоградской области популяции *T. suaveolens* слабо отличаются друг от друга генетически и охраняются на территории всех природных парков области, а также ряда особо охраняемых природных территорий, введенные меры охраны следует считать достаточными для сохранения вида.

Ключевые слова: *Tulipa schrenkii*, ISSR-анализ, программа NewHybrids, Волгоградская область.

Background. The current natural habitat of *Tulipa suaveolens* Roth rapidly decreases. In order to work out the strategy of the species' preservation, evaluation of its intra- and interpopulation polymorphism is required. **Materials and methods.** Molecular-genetic ISSR markers were used to analyze 125 samples from 10 populations of *T. suaveolens* occurring in Volgograd Province and 4 populations from Saratov Province. **Results.** ISSR analysis revealed high intrapopulation polymorphism (73–89%) in *T. suaveolens* populations from Volgograd Province. AMOVA attributed the largest proportion of variability (74.3%) to intrapopulation polymorphism. Interpopulation differences account for 25.7%. Total subdivision of populations (F_{ST}) was 0.257; total gene flow (Nm) between populations was 0.723. According to Bayesian analysis and clustering with both UPGMA and Neighbor Joining methods, all the studied *T. suaveolens* samples from Volgograd Province make up a large genetic group: within that group none of the potential subgroups may be associated with a particular place of collecting. The NewHybrids software was applied, and the results pointed to the hybrid nature of most samples. Samples of three populations from Saratov Province made up a separate genetic group; those samples fell under the category of parent forms. **Conclusion.** Considering that genetic subdivision of *T. suaveolens* populations within the administrative borders of Volgograd Province is insignificant, while all the province's natural parks and a number of protected natural areas undertake measures to preserve the species, the existing conservation strategy may be recognized as effective and sufficient.

Key words: *Tulipa schrenkii*, ISSR analysis, NewHybrids software, Volgograd Province.

Введение

В связи со стремительным сокращением ареалов распространения многих дикорастущих видов растений проблема сохранения их биологического разнообразия является в настоящее время весьма актуальной. Особенно это касается близких родственников культурных растений, которые могут служить донорами ценных генов и признаков в селекционном процессе.

Одним из таких видов является *Tulipa suaveolens* Roth (= *T. schrenkii* Regel, *T. gesneriana* L.) – высоко декоративный луковичный поликарпик семейства Liliaceae, родоначальник садовых тюльпанов (Mordak, 1990; Zonnenveld, 2009). Вид занесен в Красные книги России, Украины, Казахстана (как *T. schrenkii*) и Азербайджана (как *T. gesneriana*). Рас-

пространен в южных и юго-восточных районах Восточной Европы, включая Крым, а также на Кавказе, в Казахстане, юге Западной Сибири. Встречается по всей Волгоградской области, более часто в южной и юго-восточной части. Наиболее крупные популяции расположены в Палласовском, Чернышковском, Калачевском, Серафимовичском, Быковском и др. р-нах, одна из самых обширных – близ оз. Булхута (более 100 км²) (Popov et al., 2017). Однако высокая численность популяции далеко не всегда коррелирует с уровнем ее генетического разнообразия (Trifonova et al., 2017). Поэтому для успешного сохранения генофонда *T. suaveolens* Волгоградской области необходима оценка внутри- и межпопуляционного полиморфизма.

Такая оценка уже проводилась для популяций *T. suaveolens* Саратовской области и Республики Крым

(Kashin et al., 2016; Kritskaya et al., 2018; Kritskaya, Kashin, 2018) с помощью маркеров ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Полученные результаты позволили подтвердить рациональность распределения особо охраняемых природных территорий в указанных регионах, в полной мере охватывающих генетическое разнообразие *T. suaveolens*.

Несмотря на то что в Волгоградской области активно проводятся исследования генетического разнообразия популяций редких и исчезающих растений с помощью молекулярно-генетических методов (Khadeeva et al., 2011; Khadeeva et al., 2012; Trifonova et al., 2017), подобного рода исследования регионального масштаба до настоящего времени не затрагивали этот уязвимый вид.

Цель данной работы – оценить генетическое разнообразие и определить популяционно-генетическую структуру *T. suaveolens* в Волгоградской области с помощью ISSR-маркеров.

Материалы и методы

Сбор материала проводили в десяти природных популяциях *T. suaveolens* Волгоградской области и четырех популяциях прилегающей территории Саратовской области. Всего собрано 125 образцов, представляющих 14 популяций (табл. 1). Материалом служили листья, высушенные силикагелем.

ДНК выделяли с использованием набора NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Германия) согласно протоколу производителя. ПЦР проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany) с 10 ISSR-праймерами, синтезированными НПК «Синтол» (Москва), выбранными нами ранее для *T. suaveolens* (Kashin et al., 2016). ПЦР проводили в объеме 20 μ l. Реакционная смесь содержала 4 μ l готовой реакционной смеси MaGMix (по 200 μ M каждого dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 ед. SmarTaqDNA-полимеразы и буфер; Dialat Ltd., Москва, Россия), 15 μ l деионизированной воды, 3.4 pmol каждого праймера и 1 μ l исходной ДНК. Программа ПЦР включала следующие этапы: изначальная денатурация в течение 5 мин при 95°C, затем 35 циклов по 30 сек при 95°C, 30 сек при 44°C и 2 мин при 72°C, с финальной элонгацией в течение 10 мин при 72°C.

Полученную матрицу предварительно анализировали в программе PAST (Hammer et al., 2001) методом попарного невзвешенного среднего (UPGMA) с использованием коэффициента Жаккара и в программе SplitsTree 4 (Huson, Bryant, 2006) методом Neighbor Joining (NJ). Анализ популяционной структуры проводили методом Байеса в программе Structure 2.3 (Pritchard et al., 2000; Evanno et al., 2005; Jakobsson, Rosenberg 2007). Анализ проводился с использованием модели генетического смешения (admixture). Предва-

Таблица 1. Перечень образцов *Tulipa suaveolens* Roth, использованных в исследовании

Table 1. The list of *Tulipa suaveolens* Roth samples involved in the study

№	Место сбора / Collecting site	n	N	N _p	N/N _p
1	Волгоградская обл., Котельниковский р-н, окр. хут. Захаров Volgograd Province, Kotelnikovsky District, Zakharov farm	5	73	100	0.73
2	Волгоградская обл., Светлоярский р-н, окр. ст. Тингута Volgograd Province, Svetloyarsky District, Tinguta station	5	70	91	0.77
3	Волгоградская обл., Ленинский р-н, окр. г. Ленинск Volgograd Province, Leninsky District, Leninsk town	10	100	112	0.89
4	Волгоградская обл., Иловлинский р-н, окр. хут. Хмелевской Volgograd Province, Ilovlinsky District, Khmelevskoy farm	10	111	127	0.87
5	Волгоградская обл., Алексеевский р-н, окр. хут. Нестеровский Volgograd Province, Alekseevsky District, Nesterovsky farm	10	87	103	0.85
6	Волгоградская обл., Михайловский р-н, окр. г. Михайловка Volgograd Province, Mikhailovsky District, Mikhailovka town	10	101	117	0.86
7	Волгоградская обл., Быковский р-н, окр. с. Верхний Балыклей Volgograd Province, Bykovsky District, Verkhny Balykley village	10	90	104	0.87
8	Волгоградская обл., Палласовский р-н, берег оз. Эльтон Volgograd Province, Pallasovsky District, Elton Lake shore	5	74	93	0.80
9	Волгоградская обл., Даниловский р-н, 7 км С-З с. Орехово Volgograd Province, Danilovsky District, 7 km SW Orekhovo village	10	104	120	0.87
10	Волгоградская обл., Палласовский р-н, 3 км восточнее с. Гончары Volgograd Province, Pallasovsky District, 3 km E Gonchary village	10	94	112	0.84
11	Саратовская обл., Балашовский р-н, окр. с. Ключи Saratov Province, Balashovsky District, Klyuchi village	10	88	99	0.89
12	Саратовская обл., Красноармейский р-н, с. Каменка Saratov Province, Krasnoarmeysky District, Kamenska village	10	94	110	0.86
13	Саратовская обл., Александрово-Гайский р-н, окр. хут. Тюлюнев Saratov Province, Aleksandrovo-Gaisky District, Tyulyunev farm	10	103	114	0.90
14	Саратовская обл., Озинский р-н, окр. с. Непряхино Saratov Province, Ozinsky District, Nepryakhino village	10	71	88	0.81

Примечание. n – число образцов, изученных в отдельной локальной популяции; N – общее число ISSR-бэндов, полученных для образцов из локальной популяции; N_p – число полиморфных ISSR-бэндов; N_p/N – доля полиморфных ISSR-бэндов
Note. n – number of samples from a single locality; N – total number of ISSR loci for the samples from a locality; N_p – number of polymorphic ISSR loci; N_p/N – proportion of polymorphic ISSR loci

Анализ в программе Structure с использованием приложения Structure Harvester позволил разделить исследуемую выборку на две группы, соответствующие двум генетическим популяциям. Первую группу составили образцы популяций Волгоградской области (№№ 1–10) и популяция № 13 Саратовской области, вторую – с большей долей вероятности образцы из популяций № 11, 12 и 14 Саратовской области (рис. 2).

Похожие результаты были получены в программе NewHybrids. Во всех десяти повторностях программа выделяла образцы популяций № 11, 12 и 14 Саратовской области, а также один образец популяции № 6 Волгоградской области в группу «Pure_0» – «чистый родитель» (рис. 3). Образцы остальных популяций являлись генетически смешанными и определялись программой как гибриды F_1 , F_2 и беккроссы к выявленной родитель-

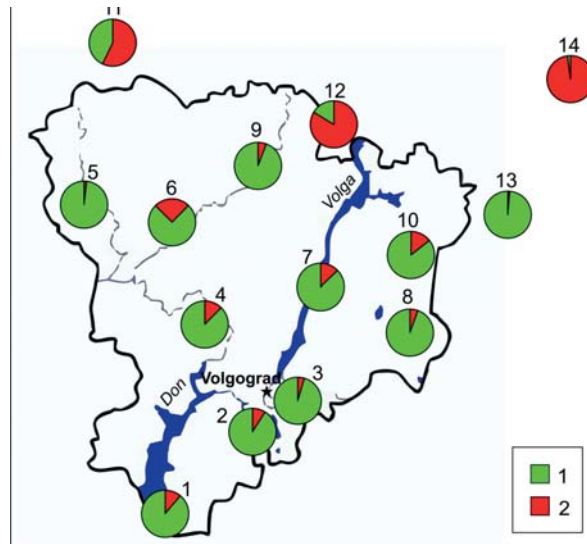


Рис. 2. Распространение генетических групп (1 и 2), выявленных в результате байесовского анализа, на изученной территории

Fig. 2. Distribution of genetic groups (1 and 2) identified in the process of Bayesian analysis in the studied area

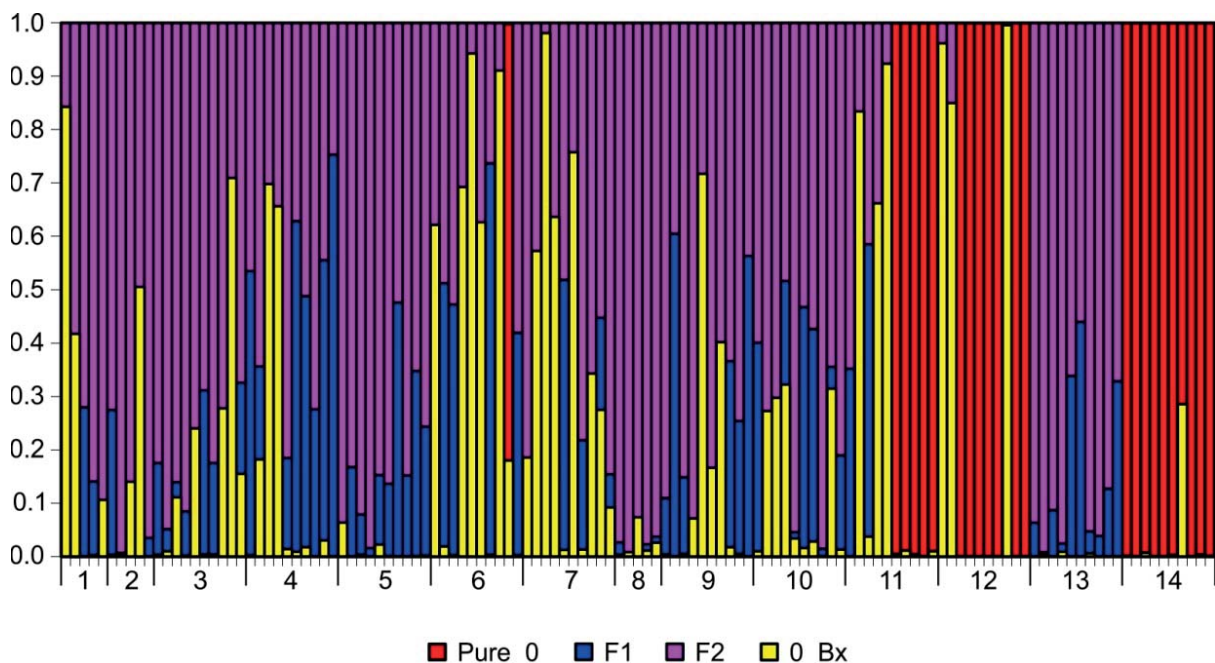


Рис. 3. Вероятность отнесения 125 исследованных образцов *Tulipa suaveolens* Roth к одной из групп по составу ISSR-бэндов в программе NewHybrids: Pure_0 – первая родительская форма; F1 – гибриды первого поколения; F2 – гибриды второго поколения; 0_Bx – беккроссы к первой родительской форме. По горизонтальной оси – номера популяций, по вертикальной – доля вероятности

Fig. 3. Probability of attributing 125 samples of *Tulipa suaveolens* Roth to one of the groups according to the composition of ISSR bands using the NewHybrids software: Pure_0 – first parent form; F1 – first generation hybrids; F2 – second generation hybrids; 0_Bx – backcrosses to the first parent form. The X-axis is population numbers; the Y-axis is probability proportions

ской форме. При этом второй «чистый родитель» (Pure_1) в исследуемой выборке обнаружен не был.

По результатам AMOVA, доля изменчивости, которая приходится на межпопуляционные различия, составляет всего 25,7%. Большая часть изменчивости (74,3%) приходится на внутривнутрипопуляционный полиморфизм (табл. 2). Общая подразделенность популяций (F_{ST}) составила 0,257, общий поток генов (Nm) между популяциями – 0,723.

В целом, по доле полиморфных бэндов исследованные популяции являются высокополиморфными. Уровень генетического разнообразия внутри популяций, произрастающих в пределах Волгоградской области, имеет сходные значения. Величина генетической подразделенности ($F_{ST} = 0,257$) между популяциями полностью соответствует значениям, полученным для изученных ранее популяций *T. suaveolens* Крыма и Саратовской области (Kashin et al., 2016; Kritskaya et al., 2018; Kritskaya, Kashin, 2018).

Таблица 2. Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) популяций *T. suaveolens* Roth

Table 2. AMOVA results for *T. suaveolens* populations

Изменчивость Source of variation	Компоненты дисперсии / Variance components				
	Степень свободы d.f.	Сумма квадратов Sum of squares	Доля дисперсии, % Percentage of variation	Индекс фиксации Fixation index	<i>p</i>
Между популяциями Among populations	13	1001.568	25.67	$F_{ST} = 0.257$	< 0.001
Внутри популяций Within populations	111	2100.800	74.33	–	–

Примечание: количество пермутаций матрицы = 1000
Note: 1000 permutations of the matrix

Согласно результатам байесовского анализа и кластеризации двумя различными методами, все исследованные особи *T. suaveolens* Волгоградской области образуют одну большую генетическую группу, в которой ни одна из потенциальных подгрупп не может быть ассоциирована с тем или иным районом сбора образцов. По-видимому, исследованные субпопуляции представляют собой остатки единой популяции, которая была географически раздроблена вследствие хозяйственной деятельности человека.

Результаты, полученные в программе NewHybrids, указывают на гибридную природу большей части особей. Примечательно то, что программой были выявлены особи, отнесенные к группе «чистый родитель» (Pure_0) в трех популяциях Саратовской области, тогда как все особи популяции Волгоградской области, за исключением одного образца из Михайловского р-на, попадали в группы «гибриды» (F_1 , F_2) и «беккроссы» (0_Vх) к нему. В нашем предыдущем исследовании (Kritskaya, Kashin, 2018), охватывавшем Крым и частично Краснодарский край, Калмыкию и одну популяцию Волгоградской области (№ 1), особи последней так же определялись программой NewHybrids как гибриды и беккроссы ко «второму родителю» («1_Vх»). При этом в категорию «первого родителя» (Pure_0) попадали образцы из Калмыкии, а «второй родитель» (Pure_1) в большинстве повторностей не был найден. Из этого следует, что наиболее вероятными родительскими формами для гибридных особей Волгоградской области являются тюльпаны, произрастающие в Калмыкии и в Саратовской области. Однако высказанное предположение носит лишь предварительный характер, поскольку для более обоснованных выводов необходимо расширение границ и методов исследования.

Заключение

Таким образом, ISSR-анализ показал, что в пределах административных границ Волгоградской области популяции *Tulipa suaveolens* слабо отличаются друг от друга генетически. Учитывая то, что растения вида охраняются на территории всех природных парков области, а также ряда «малых» ООПТ, введенные меры охраны следует считать достаточными для его сохранения. Генезис этих популяций остается неясным и требует дальнейшего изучения с привлечением метода секвенирования пластидной ДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00142.

Благодарим сотрудника Волгоградского регионального ботанического сада К. А. Гребенникова за точные координаты целого ряда мест произрастания *T. suaveolens* в Волгоградской обл.

References/Литература

- Anderson E.C., Williamson E.G., Thompson E.A. Monte Carlo evaluation of the likelihood for N_e from temporally spaced samples. *Genetics*. 2000;156(4):2109-2118.
- Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):359-361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE:

- a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611-2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564-567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Hammer O., Harper D. A.T., Ryan P.D. PAST: Palaeontologica Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):1-9.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(2):254-267. DOI: 10.1093/molbev/msj030
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007;23(14):1801-1806. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm233
- Kashin A.S., Kritskaya T.A., Schanzer I.A. Genetic polymorphism of *Tulipa gesneriana* L. evaluated on the basis of the ISSR marking data. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(10):1023-1033. DOI: 10.1134/S1022795416100045
- Khadeeva N.V., Goryunova S.V., Yakovleva Y.Y., Melnikova N.V., Kudryavtsev A.M., Kochumova A.A. et al. Genetic monitoring of populations of *Matthiola fragrans* (Bunge) using RAPD and AFLP analysis. *Biology Bulletin*. 2011;38(4):325-331. DOI: 10.1134/S1062359011040078
- Khadeeva N.V., Yakovleva E.Y., Goryunova S.V., Shishkina A.A., Kudryavtsev A.M., Kochumova A.A. et al. Characterization of the *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronov populations from Volgograd oblast using molecular genetic identification. *Russian Journal of Genetics*. 2012;48(6):599-604. DOI: 10.1134/S1022795412050109
- Kritskaya T.A., Kashin A.S. Genetic polymorphism of *Tulipa gesneriana* in the Crimea and adjacent territories. In: *Scientific works of the national Park "Khvalynsky": Collection of scientific articles on the materials of the V International scientific-practical conference "Specially protected natural areas: past, present, future"*. Vol. 10. Saratov – Khvalynsk: Amirit Press, 2018. p.80-86. [in Russian] (Крицкая Т.А., Кашин А.С. Генетический полиморфизм Тюльпана Геснера в Крыму и на прилегающих территориях. В кн.: *Научные труды Национального парка «Хвалынский»: сб. науч. ст. по материалам V научно-практической конференции «Особо охраняемые природные территории: прошлое, настоящее, будущее»*. Т. 10. Саратов – Хвалынский: ООО «Амирит»; 2018. С.80-86).
- Kritskaya T.A., Kashin A.S., Schanzer I.A., Danilov V.A. Genetic differentiation of *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) in the North-East of its range in the European part of Russia. *Botanicheskii Zhurnal = Botanical Journal*. 2018;103(2):187-200. [in Russian] (Крицкая Т.А., Кашин А.С., Шанцер И.А., Данилов В.А. Генетическая дифференциация *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) на северо-востоке ареала в европейской части России. *Ботанический журнал*. 2018;103(2):187-200). DOI: 10.1134/S0006813618020023
- Mordak H. Quid est *Tulipa schrenkii* Regel et *T. heteropetala* Ledeb. (Liliaceae)? *Novitates Systematicae Plantarum Vasculorum*, 1990;27:27-32. [in Russian] (Мордак Е.В. Что такое *Tulipa schrenkii* Regel и *T. heteropetala* Ledeb. (Liliaceae)? *Новости систематики высших растений*. 1990;27:27-32).
- Popov A.V., Lukonina A.V., Suprun N.A. *Tulipa gesneriana* L. (*T. schrenkii* Regel). In: Baranova O.G., Sagalaev V.A. (eds). *Red Data Book of Volgograd Province. Vol. 2. Plants and other organisms (Krasnaya kniga Volgogradskoy oblasti. T. 2. Rasteniya i drugie organizmy)*. Voronezh: Izdat-Print; 2017. p.151 [in Russian] (Попов А.В., Луконина А.В., Супрун Н.А. Тюльпан Геснера (Шренка). В кн.: *Красная книга Волгоградской области. Т. 2. Растения и другие организмы* / под ред. О.Г. Барановой, В.А. Сагалаева. Воронеж: ООО «Издатель-Принт»; 2017. С.151).
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
- Trifonova A.A., Kochieva E.Z., Kudryavtsev A.M. Low level of genetic differentiation among populations of the rare species *Allium regelianum* A.K. Becker ex Iljin from the Volgograd region detected by ISSR-analysis. *Ecological Genetics*. 2017;15(1):30-37. [in Russian] (Трифонова А.А., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М. Низкий уровень подразделенности популяций редкого вида *Allium regelianum* А.К. Becker ex Iljin Волгоградской области на основе данных ISSR-анализа. *Экологическая генетика*. 2017;15(1):30-37). DOI: 10.17816/ecogen15130-37
- Zonneveld B.J.M. The systematic value of nuclear genome size for "all" species of *Tulipa* L. (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 2009;281(1-4):217-245. DOI: 10.1007/s00606-009-0203-7

Прозрачность финансовой деятельности/The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования/How to cite this article

Крицкая Т.А., Кашин А.С. Оценка генетического разнообразия популяций *Tulipa suaveolens* Волгоградской области. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2019;180(4):88-93. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-88-93

Kritskaya T.A., Kashin A.S. Genetic diversity of *Tulipa suaveolens* Roth populations in Volgograd province. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(4):88-93. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-88-93

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы/The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны/Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-4-88-93>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы/The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует/No conflict of interest