

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-PCR МАРКЕРОВ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ НА УРАЛЕ

Нечаева Ю.С.<sup>1,2</sup>, Боронникова С.В.<sup>1,2</sup>, Пришнивская Я.В.<sup>1,2</sup>, Чумак Е.И.<sup>1</sup>, Юсупов Р.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, e-mail: [yulianechaeva@mail.ru](mailto:yulianechaeva@mail.ru), [SVBoronnikova@yandex.ru](mailto:SVBoronnikova@yandex.ru);

<sup>2</sup>Естественнонаучный институт ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, e-mail: [yana\\_prishnivskaya@mail.ru](mailto:yana_prishnivskaya@mail.ru)

Проведен анализ полиморфизма ДНК с использованием ISSR-метода (межмикросателлитный анализ) семи популяций *Larix sibirica* Ledeb., искусственного и природного происхождения, расположенных в Пермском крае и Свердловской области. Выявлено 119 ISSR-маркеров, из которых 116 ( $P_{95}=0,974$ ) были полиморфными. Семь изученных популяций лиственницы сибирской обладали различными уровнями генетического разнообразия. При сравнении трех различных групп популяций генетическая изменчивость выше в искусственных насаждениях и в природных популяциях из горной части Урала, и ниже в природных популяциях из равнинной центральной части Пермского края. Определена генетическая структура и установлено, что семь изученных популяций значительно дифференцированы ( $G_{ST}=0,543$ ). Даны рекомендации для разработки программ сохранения и восстановления популяций ценного хвойного вида *L. sibirica*.

Ключевые слова: ISSR-маркеры, полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, генетическая структура популяций, *Larix sibirica* Ledeb.

## THE ANALYSIS OF ISSR-PCR MARKERS POLYMORPHISM AND GENETIC STRUCTURE OF SOME POPULATIONS OF *LARIX SIBIRICA* LEDEB. IN URAL

Nechaeva Yu.S.<sup>1,2</sup>, Boronnikova S.V.<sup>1,2</sup>, Prishnivskaya Ya.V.<sup>1,2</sup>, Chumak E.I.<sup>1</sup>, Yusupov R.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perm State University, Perm, e-mail: [yulianechaeva@mail.ru](mailto:yulianechaeva@mail.ru), [SVBoronnikova@yandex.ru](mailto:SVBoronnikova@yandex.ru);

<sup>2</sup>Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, e-mail: [yana\\_prishnivskaya@mail.ru](mailto:yana_prishnivskaya@mail.ru)

We have analysis of ISSR-markers polymorphism of seven populations of *Larix sibirica* Ledeb., cultural and natural origins, located in the Perm and the Sverdlovsk regions. It was found 119 ISSR-markers, of which 116 ( $P_{95}=0,974$ ) were polymorphic. Seven studied populations of *L. sibirica* had different levels of genetic diversity. When comparing the three groups of populations, genetic variability was higher in cultured populations and in natural populations of the mountainous part of the Urals, it is lower in natural populations of the flat central part of the Perm region. We defined the genetic structure of populations and found that the studied seven populations highly differentiated ( $G_{ST}=0,543$ ). We have made recommendations for developing programs for the conservation and reproduction of populations of *L. sibirica*.

Keywords: ISSR-markers, DNA polymorphism, genetic diversity, genetic structure, *Larix sibirica* Ledeb.

Изучение генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации лесобразующих видов хвойных, в том числе и видов рода *Larix*, имеющих важное биосферное и ресурсное значение, является одной из важнейших задач популяционной биологии. Только на основании точных сведений о генетической структуре популяций хвойных, уровне их генетической изменчивости и характере ее распределения в пределах ареалов видов может быть оценен генетический потенциал видов и разработан для каждого из них комплекс мероприятий, направленных на максимальное сохранение генетического разнообразия в процессе их использования и воспроизводства [1]. Генетическое разнообразие лиственницы сибирской на Урале изучалось В.Л. Семериковым на основании полиморфизма цитоплазматических маркеров и частично ядерных генов [7]. Однако

полиморфизм межмикросателлитных молекулярных маркеров в геноме этого вида до настоящего времени не был исследован, в том числе в популяциях *L. sibirica* Пермского края.

**Цель данной работы** – выявление полиморфизма ISSR-PCR маркеров, параметров генетического разнообразия и генетической структуры семи популяций лиственницы сибирской на Урале.

### **Материал и методы**

В 2009-2014 гг. было изучено семь популяций *Larix sibirica* Ledeb (семейство *Pináceae*). Шесть из изученных популяций находятся в Пермском крае: две популяции являются природными и расположены в равнинных областях (*Ls1* около пос. Полазна в центральной части края, *Ls2* около г. Оса на юго-западе края); две популяции являются искусственными насаждениями (*Ls4* на территории ООПТ «Парковый» Очерского района в западной части Пермского края, заложены известным лесоведом Ф.А. Теплоуховым; *Ls5* в Кишертском районе на территории учебно-научной базы «Предуралье» в восточной части края); две популяции расположены на северо-востоке края в заповеднике «Вишерский» в горно-лесном поясе западного склона Уральских гор (*Ls6* на западном склоне хребта Тулымский камень, *Ls7* на правом берегу р. Таборная). В Свердловской области около пос. Билимбай в зоне низкогорной тайги находится еще одна природная популяция *L. sibirica* (*Ls3*). Она интересна тем, что расположена с восточной стороны Уральских гор.

Для молекулярно-генетического анализа в каждой популяции была собрана хвоя с 28-32 деревьев примерно одного возраста, расстояние между деревьями составляло не менее 80 м. Наименьшее расстояние между популяциями – 50 км, среднее расстояние между популяциями – 200 км. Полиморфизм ДНК проанализирован у 205 отдельных деревьев. ДНК выделяли из 20 мг высушенной хвои с использованием СТАВ-метода с добавлением в качестве сорбента PVPP (polyvinylpyrrolidone) [5]. Концентрацию и спектральные характеристики ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA). Тотальная ДНК была разбавлена до рабочей концентрации 10 нг/мкл. Молекулярно-генетический анализ проведен с использованием ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) - метода анализа полиморфизма ДНК [10]. Анализ эффективности произведен у 20 ISSR-праймеров по методике, предложенной Р.Н. Календарем и С.В. Боронниковой [2] по шкале от 1 (низкая) до 5 (самая высокая). Реакционная смесь для ISSR-ПЦР объемом 25 мкл содержала: 2 единицы *Tag*-полимеразы, 2,5 мкл стандартного 10x ПЦР-буфера, 25 пМ праймера, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,25 mM dNTP, 5 мкл геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере GeneAmp PCRSystem 9700 (Applied Biosystems, USA) по типичной для ISSR-метода программе: предварительная денатурация 94 °С, 2 мин.; первые пять циклов 94 °С, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72 °С, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94 °С, 5 сек.; t°

отж., 5 сек.; 72 °С, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72 °С. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 56 до 64 °С. В качестве отрицательного (К-) контроля в реакцию смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7%-ном агарозном геле. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100bp+1.5+3Kb DNA Ladder, ООО «СибЭнзим-М», Москва). Компьютерный анализ полиморфизма ДНК проведен с помощью программы POPGENE 1.32 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel. Для описания генетической структуры популяций *L. sibirica* были использованы следующие параметры [8]: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ) во всей популяции как мера общего генного разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_S$ ) в субпопуляции как мера ее внутривидового разнообразия; доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ). Генетическое расстояние ( $D$ ) между популяциями определено по формуле М. Нея и В. Ли [9].

### Результаты и их обсуждение

Каждый из 20 ISSR-праймеров был индивидуально проанализирован в ПЦР с геномной ДНК *L. sibirica*. В результате для данного вида отобраны 5 эффективных ISSR-праймеров, они выявляли наибольшее число четко амплифицирующихся и стабильно воспроизводимых фрагментов ДНК: М3 [(AC)<sub>8</sub>CT], М9 [(ACC)<sub>6</sub>G], X10 [(AGC)<sub>6</sub>C], ISSR-8 [(GAG)<sub>6</sub>C], CR-215 [(CA)<sub>6</sub>GT]. Из них 2 праймера являются динуклеотидными, а 3 праймера – тринуклеотидными, так называемые якорные нуклеотиды отмечены как одно-, так и двунуклеотидные.

В семи популяциях *L. sibirica* было детектировано 119 ISSR-PCR маркеров, из которых 116 были полиморфными ( $P_{95} = 0,974$ ). В среднем один ISSR-праймер инициировал у *L. sibirica* синтез 17,1 фрагментов ДНК (рис. 1).

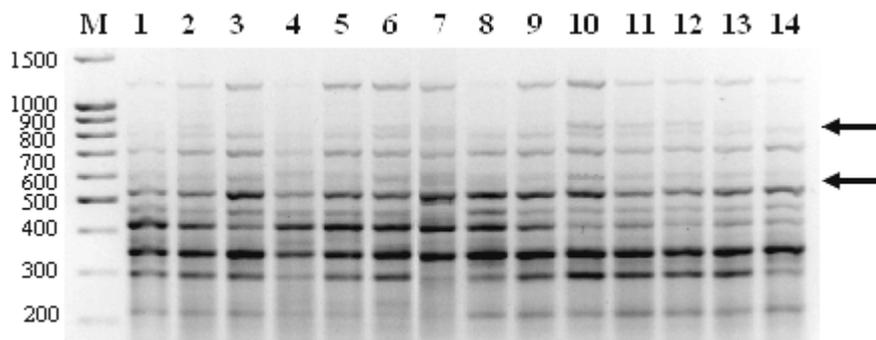


Рис. 1. ISSR-спектр популяции *LsI* с праймером X10. М – маркер молекулярного веса, 1-4 – номера проб ДНК, стрелками обозначены некоторые полиморфные фрагменты.

Доля полиморфных локусов выше в популяции *Ls5* ( $P_{95}=0,830$ ), ниже в *Ls2* ( $P_{95}=0,479$ ). Из 119 ISSR-маркеров 14 (11,8%) являются уникальными, они представлены только в одной популяции, а 105 ISSR-маркеров (88,2%) являются общими для всех семи исследованных популяций. При сравнении доли полиморфных локусов по критерию Фишера популяция *Ls5* имеет значимые отличия от всех остальных популяций ( $F>F_{st}=1,96$ ). Также значимая разница по этому показателю обнаружена между популяцией *Ls2*, популяциями *Ls1* и *Ls4*. Самой распространенной мерой генетической изменчивости в популяции является гетерозиготность. Ожидаемая гетерозиготность ( $H_E$ ) на общую выборку составила 0,125 (табл. 1). Этот показатель наибольший в популяции *Ls5* ( $H_E = 0,168$ ), а наименьший – в популяции *Ls2* ( $H_E=0,074$ ), данные значения достоверно отличаются ( $F=2,149>F_{st}=1,96$ ) при использовании критерия Фишера.

Таблица 1

Генетическое разнообразие изученных популяций *L. sibirica*

Популяции/ показатели	<i>Ls1</i>	<i>Ls2</i>	<i>Ls3</i>	<i>Ls4</i>	<i>Ls5</i>	<i>Ls6</i>	<i>Ls7</i>	На выборку
$P_{95}$	0,605	<u>0,479</u>	0,554	0,638	<b>0,830</b>	0,558	0,487	0,974
$H_E$	0,121 (0,117)	<u>0,074</u> (0,013)	0,124 (0,017)	0,157 (0,017)	<b>0,168</b> (0,015)	0,135 (1,018)	0,093 (0,015)	0,125 (0,008)
$n_a$	1,369 (0,484)	<u>1,268</u> (0,445)	1,352 (0,479)	1,470 (0,501)	<b>1,630</b> (0,484)	1,386 (0,489)	1,285 (0,453)	2,000 (0,000)
$n_e$	1,207 (0,341)	<u>1,119</u> (0,257)	1,208 (0,326)	<b>1,260</b> (0,340)	1,256 (0,285)	1,232 (0,349)	1,159 (0,308)	1,442 (0,321)
$R$	2	0	0	1	<b>10</b>	0	1	14

Примечание:  $P_{95}$  – доля полиморфных локусов,  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $n_a$  – абсолютное число аллелей на локус;  $n_e$  – эффективное число аллелей на локус, в скобках даны стандартные отклонения;  $R$  – число редких аллелей; жирным шрифтом выделены максимальные, а подчеркиванием – минимальные значения.

Для характеристики генетической структуры популяций важны также редкие, то есть встречающиеся с частотой менее 5% маркеры. В изученных популяциях *L. sibirica* выявлено 14 редких ISSR-PCR маркеров. Наибольшее число редких аллелей ( $R = 10$ ) отмечено в популяции *Ls5* (рис. 2).

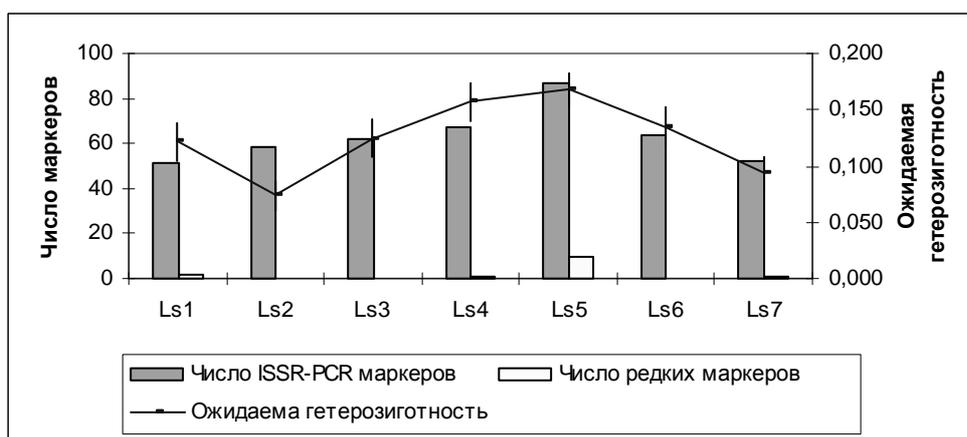


Рис. 2. Выявленные ISSR-PCR маркеры и ожидаемая гетерозиготность в изученных популяциях *L. Sibirica*.

Абсолютное число аллелей выше (табл. 1) в популяциях **Ls5** ( $n_a=1,630$ ) и **Ls4** ( $n_a=1,470$ ). Эффективное число аллелей оказалось наибольшим в популяции **Ls4** ( $n_e=1,260$ ) и близко по значению в популяции **Ls5** ( $n_e=1,256$ ). Этот показатель достоверно ниже в двух популяциях **Ls2** ( $n_e=1,119$ ) и **Ls7** ( $n_e=1,159$ ). Полученные нами данные согласуются с приведенными в литературе показателями генетического полиморфизма по ISSR-PCR маркерам для хвойных видов растений. Так, для ели гибридной доля полиморфных локусов в популяциях составляет 0,970, абсолютное и эффективное число аллелей также близки к таковым для лиственницы сибирской ( $n_a=1,970$  и  $n_e=1,463$ ) [6]. У сосны обыкновенной [3; 4] отмечена меньшая доля полиморфных локусов (0,940) по сравнению с изученными нами популяциями *L. sibirica*. Эффективное число аллелей в популяциях сосны обыкновенной ( $n_e=1,405$ ) близко к значениям, установленным для других хвойных видов растений.

При сравнении трех групп популяций *L. sibirica* (искусственные насаждения, природные равнинные популяции, природные горные и предгорная популяции) доля полиморфных локусов достоверно выше в группе популяций искусственного происхождения ( $P_{95}=0,848$ ) по сравнению с группами природных популяций ( $F=4,8 > F_{st}=1,96$ ). Однако другие показатели генетического разнообразия ( $H_E = 0,223$ ;  $n_e = 1,368$ ) выше в группе горных и предгорной популяций данного вида (табл. 2). Значимо наиболее низкие показатели генетического разнообразия установлены в природных популяциях, расположенных в равнинных частях Пермского края ( $P_{95}=0,563$ ;  $H_E = 0,169$ ;  $n_e = 1,284$ ).

Таблица 2

Генетическое разнообразие трех групп популяций *L. sibirica*

Популяции/ показатели	Природные равнинные (Ls1, Ls2)	Искусственные насаждения (Ls4, Ls5)	Природные горные и предгорная (Ls3, Ls6, Ls7)

$P_{95}$	<u>0,563</u>	<b>0,848</b>	0,756
$H_E$	<u>0,169</u> (0,018)	0,214 (0,014)	<b>0,223</b> (0,017)
$n_e$	<u>1,284</u> (0,352)	1,329 (0,289)	<b>1,368</b> (0,353)

Примечание:  $P_{95}$  – доля полиморфных локусов,  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $n_e$  – абсолютное число аллелей на локус;  $n_e$  – эффективное число аллелей на локус, в скобках даны стандартные отклонения; жирным шрифтом выделены максимальные, а подчеркиванием – минимальные значения.

Анализ генетической структуры изученных популяций *L. sibirica* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ) на общую выборку составила 0,273, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам ( $H_S$ ) равна 0,125. Коэффициент подразделенности популяций показывает, что на межпопуляционную компоненту приходится 54,35% всего генетического разнообразия (табл. 3). Наибольшая дифференциация между популяциями *L. sibirica* установлена с использованием праймера X10.

Таблица 3

Генетическая структура изученных популяций *L. sibirica*

ISSR-праймер	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
M3	0,285 (0,023)	0,162 (0,012)	0,432
M9	0,308 (0,025)	0,147 (0,006)	0,521
X10	0,249 (0,036)	0,080 (0,005)	<b>0,681</b>
ISSR-8	0,296 (0,030)	0,130 (0,006)	0,559
CR-215	0,265 (0,035)	0,117 (0,006)	0,557
На общую выборку	<b>0,273</b> (0,024)	<b>0,125</b> (0,008)	<b>0,543</b>

Примечание:  $H_T$  – общее генное разнообразие;  $H_S$  – внутривидовое разнообразие;  $G_{ST}$  – показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения.

Наименьшее генетическое расстояние отмечено между популяциями *Ls6* и *Ls7* ( $D=0,105$ ), а наибольшее – между популяциями *Ls2* и *Ls7* ( $D=0,414$ ).

### Заключение

Изученные семь популяций *L. sibirica* характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия на основании полиморфизма ISSR-маркеров. Доля полиморфных локусов в общей выборке составила 97,4%, а ожидаемая гетерозиготность – 0,125. Из семи изученных популяций самые высокие показатели генетического разнообразия отмечены в искусственных насаждениях *Ls5* ( $P_{95} = 0,830$ ;  $H_E = 0,168$ ;  $n_e = 1,256$ ;  $R = 10$ ) и *Ls4* ( $P_{95} = 0,638$ ;  $H_E = 0,157$ ;  $n_e = 1,260$ ;  $R = 1$ ), а самые низкие – в природной популяции *Ls2* ( $P_{95} = 0,479$ ;  $H_E = 0,074$ ;  $n_e = 1,119$ ;  $R = 0$ ). Наибольшее число редких аллелей ( $R = 10$ ) отмечено также в популяции *Ls5*. Полученные результаты согласуются с литературными данными о

полиморфизме ISSR-PCR маркеров для других видов хвойных растений. Генетически наиболее близки природные горные популяции *Ls6* и *Ls7* ( $D=0,105$ ), расположенные на меньшем географическом расстоянии, наиболее генетически далеки популяции *Ls2* и *Ls7* ( $D=0,414$ ). Исследованные популяции *L. sibirica* значительно дифференцированы, в связи с чем для сохранения генофонда необходимо выбирать популяции из разных частей ареала с учетом происхождения, а также географических и экологических условий произрастания популяций.

На основании результатов исследований даны следующие рекомендации.

1. Для сохранения и возобновления генетических ресурсов *L. sibirica* на Урале рекомендуется использовать искусственные насаждения лиственницы сибирской *Ls5* ( $P_{95}=0,830$ ;  $H_E=0,168$ ;  $n_e=1,256$ ;  $R=10$ ) и *Ls4* ( $P_{95}=0,638$ ;  $H_E=0,157$ ;  $n_e=1,260$ ;  $R=1$ ), заложенные еще Ф.А. Теплоуховым; одну популяцию, расположенную в центральной равнинной части Пермского края *Ls1* ( $P_{95}=0,605$ ;  $H_E=0,121$ ;  $n_e=1,207$ ;  $R=2$ ); а также популяцию из горно-лесного пояса Урала *Ls6* ( $P_{95}=0,558$ ;  $H_E=0,135$ ;  $n_e=1,232$ ;  $R=0$ ).

2. При отборе деревьев для лесовосстановления необходимо учитывать их генотип, а также наличие редких ISSR-PCR маркеров, которые наряду с другими молекулярными маркерами могут быть использованы и для молекулярно-генетической идентификации популяций.

3. Для сохранения генетического разнообразия лиственницы сибирской на популяционном уровне необходимо учитывать генетическую структуру популяций и уровень внутри- и межпопуляционной дифференциации.

***Работа выполнена при финансовой поддержке задания 2014/153 на оказание государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России (№ гос. регистрации 01201461915).***

### Список литературы

1. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России / отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин; Рос. академ. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т леса им. В.Н. Сукачева. – Новосибирск : Гео, 2010. – 159 с.
2. Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы IV Московского междунар. конгр. Ч. 2. – М. : ЗАО «Экспобиохимтехнологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. – 121 с.

3. Молекулярно-генетический анализ популяций хвойных видов растений на Урале и востоке европейской части России для сохранения и возобновления лесных ресурсов / Ю.С. Нечаева [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. - Т. 16. - № 1 (3). – С. 878-882.
4. Новиков П.С. Применение ISSR-PCR маркеров для изучения внутривидового генетического полиморфизма сосны обыкновенной на объектах единого генетико-селекционного комплекса : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2013. – 22 с.
5. Оптимизация методик выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края / Ю.С. Нечаева [и др.] // Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование : материалы Междунар. науч. конф. Т. 2. (Пермь, 21-25 нояб. 2011 г.) – Пермь, 2011. – С. 278–282.
6. Прохорова А.А., Шейкина О.В., Гладков Ю.Ф. Генетическая изменчивость вегетативных потомств плюсовых деревьев ели на архиве клонов в Республике Марий Эл // Вестник ПГТУ. – 2013. - № 2. – С. 91-100.
7. Семериков В.Л., Семерикова С.А., Полежаева М.А. Нуклеотидное разнообразие и неравновесие по сцеплению потенциально адаптивно-значимых генов *Larix sibirica* // Генетика. – 2013. - Т. 49, № 9. – С. 1055-1064.
8. Nei M. Molecular population genetics and evolution. – Amsterdam, 1975. – 278 p.
9. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. - V. 76. – P. 5269 – 5273.
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. - V. 20. – P. 76–183.

**Рецензенты:**

Янбаев Ю.А., д.б.н., профессор, проректор по учебной работе ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа.

Плотникова Е.Г., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБОУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» (ИЭГМ УрО РАН), г. Пермь.