

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *POPULUS NIGRA* L. НА СРЕДНЕМ И ЮЖНОМ УРАЛЕ НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-МАРКЕРОВ

Никоношина Н.А.<sup>1</sup>, Мартыненко Н.А.<sup>1</sup>, Нечаева Ю.С.<sup>1,2</sup>, Пришнивская Я.В.<sup>1,2</sup>,  
Боронникова С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), Пермь, e-mail: nat08.11@yandex.ru;

<sup>2</sup>Естественно-научный институт ПГНИУ, Пермь, e-mail: yulianechaeva@mail.ru

Молекулярно-генетический анализ проведен у четырех популяций *Populus nigra* L., расположенных на Среднем и Южном Урале. В четырёх изученных популяциях тополя чёрного на Среднем и Южном Урале выявлено 49 ISSR-маркеров, из которых 43 ( $P_{95}=0,878$ ) были полиморфными. Наибольшие значения параметров генетического разнообразия отмечены в популяции *P. nigra* *Pn\_3* ( $H_E=0,233$ ;  $n_e=1,425$ ;  $R=2$ ;  $P_{95}=0,788$ ), а наименьшие – в популяции *Pn\_1* ( $H_E=0,187$ ;  $n_e=1,302$ ;  $R=0$ ). Наименьшая доля полиморфных локусов ( $P_{95}=0,725$ ) отмечена в популяции *Pn\_4*. Наименьшее генетическое расстояние между исследуемыми популяциями *P. nigra* отмечено между *Pn\_2* «Бирск» и *Pn\_4* «Стерлитамак» ( $D=0,132$ ), наиболее генетически удаленными являются популяции *Pn\_1* «Спасская гора» и *Pn\_4* «Стерлитамак» ( $D=0,242$ ). Анализ генетической структуры изученных популяций показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей выборке ( $H_T$ ) составила 0,291, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в субпопуляции ( $H_S$ ) – 0,221, поэтому коэффициент подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) невысок и равен 0,239. На межпопуляционную компоненту генетического разнообразия тополя чёрного приходится 23,9%, а на внутривидовую – 76,1%. Из этого следует, что изученные популяции *P. nigra* на Среднем и Южном Урале дифференцированы в средней степени. Даны рекомендации по сохранению генетического разнообразия изученных популяций тополя чёрного на Среднем и Южном Урале.

Ключевые слова: полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, ISSR-PCR маркеры, генетическая структура популяций, *Populus nigra* L.

## MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF POPULATIONS OF *POPULUS NIGRA* L. IN THE MIDDLE AND SOUTHERN URALS BASED ON POLYMORPHISM OF ISSR-MARKERS

Nikonoshina N.A.<sup>1</sup>, Martynenko N.A.<sup>1</sup>, Nechaeva Yu.S.<sup>1,2</sup>, Prishnivskaya Ya.V.<sup>1,2</sup>,  
Boronnikova S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perm State University (PSU), Perm, e-mail: nat08.11@yandex.ru;

<sup>2</sup>Natural-Science Institute of Perm State University, Perm, e-mail: yulianechaeva@mail.ru

Molecular genetic analysis was conducted on four populations of *Populus nigra* L., located on the Middle and Southern Urals. Forty nine ISSR-markers was identified on studied populations of black poplar; 43 of them ( $P_{95}=0,878$ ) were polymorphic. The maximum values of genetic diversity was in population of *P. nigra* *Pn\_3* ( $H_E=0,233$ ;  $n_e=1,425$ ;  $R=2$ ;  $P_{95}=0,788$ ) and minimum in population *Pn\_1* ( $H_E=0,187$ ;  $n_e=1,302$ ;  $R=0$ ). The lowest proportion of polymorphic loci ( $P_{95}=0,725$ ) was in population *Pn\_4*. The least genetic distance between studied populations of *P. nigra* noted between *Pn\_2* «Birsks» and *Pn\_4* «Sterlitamak» ( $D=0,132$ ), populations *Pn\_1* «Spasskaya gora» and *Pn\_4* «Sterlitamak» were the most genetically remote ( $D=0,242$ ). Analysis of the genetic structure of studied populations showed, that the expected proportion of heterozygous genotypes in the total sample ( $H_T$ ) was 0,291, and the expected proportion of heterozygous genotypes in a subset ( $H_S$ ) was 0,221, so the ratio of population subdivision ( $G_{ST}$ ) was low and was equal 0,239. Almost 24% accounted on the inter-population component of genetic diversity of black poplar and almost 76% – on intra-population. From this it followed, that the studied population of *P. nigra* in the Middle and Southern Urals differentiated moderate. The recommendations for the conservation of genetic diversity of studied populations of black poplar in the Middle and South Urals were given.

Keywords: DNA polymorphism, genetic diversity of ISSR-PCR markers, genetic structure of populations, *Populus nigra* L.

Для разработки стратегии сохранения и рационального природопользования лесных ресурсов, обеспечивающей удовлетворение экономических потребностей общества и охрану биоразнообразия природных сообществ, необходимы глубокие знания о состоянии генофондов основных лесообразующих древесных видов растений [2]. Род *Populus* является модельным для генетических исследований древесных видов растений благодаря небольшому размеру генома, незначительной генетической изменчивости, быстрым темпам роста по сравнению с другими древесными видами [9]. *Populus trichocarpa* L. – первый вид из древесных растений, чей геном был секвенирован [13]. *P. nigra* играет важнейшую роль при сохранении пойменных экосистем и используется как источник древесины в промышленности и строительстве. Большое генетическое разнообразие и проблемы в таксономии клонов и гибридов указывают на применение именно популяционного подхода для изучения *P. nigra* [14]. Геном тополя чёрного не секвенирован полностью, но посредством молекулярного маркирования и SNP (Single Nucleotide Polymorphism) активно изучается как ядерная [5; 6; 12], так и хлоропластная [8; 15], а также митохондриальная ДНК [7]. В Пермском крае изучено генетическое разнообразие популяций тополя дрожащего на основании полиморфизма ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)-PCR маркеров и SNP-маркеров [4]. Генетическое разнообразие популяций *P. nigra* изучено на Среднем и Южном Урале на основе полиморфизма SSR (Single Nucleotide Repeats)-PCR маркеров [3], которые выявляют полиморфизм микросателлитных локусов. В качестве молекулярных маркеров, как показано на примере других видов тополей (*P. tremula*) на Урале [4], эффективны ISSR-маркеры, используемые при анализе полиморфизма межмикросателлитных последовательностей. Изучение генетического разнообразия, генетической структуры и дифференциации популяций тополя чёрного на Среднем и Южном Урале на основании межмикросателлитного анализа ранее не проводилось.

**Целью** данного исследования являлось определение генетического разнообразия и генетической структуры у четырёх популяций *P. nigra* на Среднем и Южном Урале на основании полиморфизма ISSR-PCR маркеров.

#### **Материал и методы исследования**

Объектами исследований являлись четыре популяции *P. nigra* из разных ботанико-географических районов Среднего и Южного Урала: первая популяция (*Pn\_1*, или Спасская гора), расположенная в историко-природном комплексе «Спасская гора» в зоне островной Кунгурской лесостепи южной тайги Пермского края (Средний Урал); вторая популяция (*Pn\_2*, или Бирск) находится около г. Бирск Республики Башкортостан в лесостепном районе Южного Урала; третья популяция (*Pn\_3*, или Стерлитамак), расположенная около г. Стерлитамак Республики Башкортостан в степном районе Южного Урала; четвертая

популяция ( $Pn_4$ , или Инзер) находится на территории Южно-Уральского заповедника в горном районе Южного Урала. Минимальное географическое расстояние между популяциями составило около 137 км (между  $Pn_3$  и  $Pn_4$ ), а максимальное – около 380 км (между  $Pn_1$  и  $Pn_3$ ).

Для молекулярно-генетического анализа *P. nigra* были собраны листья с 30-32 случайно избранных деревьев на расстоянии не менее 50 м друг от друга. Для выделения ДНК использовали модифицированную методику S.O. Rogers [11], в которой использовали в качестве детергента СТАВ+PVPP (цетилтриметиламониум бромид + поливинилполипирролидон). При выделении ДНК из листьев брали навеску по 100 мг. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) и для ПЦР выравнивали до 10 нг/мкл.

Анализ генетического разнообразия популяций *P. nigra* проведен ISSR-методом анализа полиморфизма ДНК [16]. Для полимеразной цепной реакции ISSR-PCR-методом реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 2 единицы *Tag*-полимеразы («Силекс М», Россия); 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 25 пМ праймера («Синтол», Россия); 2,5 mM  $MgCl_2$  («Силекс М», Россия); 0,25 mM dNTP («Fermentas», Литва); 5 мкл тотальной ДНК. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) по стандартной для ISSR-PCR-метода программе [1] с пятью ISSR-PCR-праймерами. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7%-ном агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе геле-документации GelDoc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса ООО «СибЭнзим-М» (Москва) и программу Quantity One (Bio-Rad, USA).

Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью общепринятых компьютерных программ POPGENE 1.31 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel с определением доли ( $P_{95}$ ) полиморфных локусов, абсолютного ( $n_a$ ) числа аллелей, эффективного ( $n_e$ ) числа аллелей, ожидаемой ( $H_E$ ) гетерозиготности. Для описания генетической структуры популяции были использованы следующие параметры: 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 ( $G_{ST}$ ).

На основе матрицы бинарных признаков была рассчитана матрица генетических различий, на основании которой невзвешенным парно-групповым методом UPGMA (unweighed pair-group method using arithmetic average) была построена дендрограмма, отражающая степень сходства исследуемых популяций по ISSR-спектрам при помощи компьютерных программ Treescan 1.3b. Генетическое расстояние между ценопопуляциями определяли по формуле М. Нея и В. Ли [10].

### Результаты и их обсуждение

В четырех популяциях *P. nigra* выявлено 49 ISSR-PCR-маркеров, из которых 43 ( $P_{95}=0,878$ ) были полиморфными. Число амплифицированных ISSR-маркеров варьировало в зависимости от праймера от 12 (праймер CR-215, X10, M27) до 13 (праймер M3), а их диапазон длин от 210 до 740 пн. Установлено, что число полиморфных маркеров в общей выборке изменялось от 10 до 12, а доля полиморфных локусов ( $P_{95}$ ) в зависимости от ISSR-праймера варьировала от 0,769 до 1. Наименьшая доля полиморфных локусов ( $P_{95}=0,725$ ) отмечена в популяции *Pn\_4*, а наибольшая ( $P_{95}=0,788$ ) – в *Pn\_3*.

Ожидаемая гетерозиготность ( $H_E$ ) в общей выборке *P. nigra* составила  $H_E=0,221$ . Наибольшие значения ожидаемой гетерозиготности ( $H_E=0,233$ ) отмечены в *Pn\_3*, а наименьшие ( $H_E=0,187$ ) – в *Pn\_1*. Абсолютное число аллелей ( $n_a$ ) в общей выборке равно 1,878, а эффективное число аллелей ( $n_e$ ) – 1,494. Максимальный показатель ( $n_a = 1,593$ ) отмечен в популяции *Pn\_3*, а минимальный ( $n_a = 1,550$ ) – в *Pn\_1*. Наибольшее значение эффективных аллелей ( $n_e$ ) выявлено также в популяции *Pn\_4* и составило 1,425, а наименьшее – в *Pn\_1* и оказалось равным 1,302.

Для характеристики генетического разнообразия популяций важны редкие (R), то есть встречающиеся с частотой менее 5%, маркеры. В изученных популяциях *P. nigra* выявлено 6 редких ISSR-маркеров, которые равномерно распределены (R=2) в популяциях *Pn\_1*, *Pn\_2*, *Pn\_4*, а в *Pn\_3* они отсутствовали.

Все вышеперечисленные данные свидетельствуют о том, что популяция *Pn\_3*, произрастающая вблизи г. Стерлитамак, характеризуется более высоким уровнем генетического разнообразия в сравнении с другими изученными популяциями ( $H_E = 0,233$ ;  $n_e=1,425$ ; R=2), а популяция *Pn\_1* («Спасская гора») – наиболее низкими показателями генетического разнообразия ( $H_E = 0,187$ ;  $n_e = 1,302$ ; R=0).

В результате молекулярно-генетического анализа популяций тополя чёрного на основании полиморфизма микросателлитных последовательностей наибольшие показатели генетического разнообразия ( $n_a = 7,667$ ;  $n_e = 3,948$ ;  $H_E = 0,715$ ) были также выявлены в *Pn\_3*, а наименьшие – в *Pn\_1* ( $n_a=4,167$ ;  $n_e=2,585$ ), но наименьшей ожидаемой гетерозиготностью ( $H_E = 0,517$ ) обладает популяция *Pn\_4* [3].

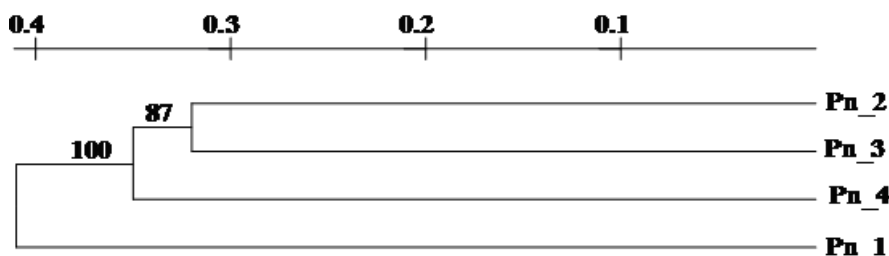
Анализ генетической структуры четырех популяций *P. nigra* показал, что общее генное разнообразие или ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей выборке ( $H_T$ ) составило 0,291, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в субпопуляции ( $H_S$ ) – 0,221. Показатель подразделённости популяций ( $G_{ST}$ ) невысок и равен 0,239 (табл.). Наименьшее генетическое расстояние между исследуемыми популяциями *P. nigra* отмечено между  $Pn\_2$  «Бирск» и  $Pn\_3$  «Стерлитамак» ( $D=0,132$ ), наиболее генетически удаленными являются популяции  $Pn\_1$  «Спасская гора» и  $Pn\_3$  «Стерлитамак» ( $D=0,242$ ).

Генетическая структура и дифференциация четырех популяций *P. nigra*

ISSR-праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→ 3')	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
M3	(AC) <sub>8</sub> CT	0,266 (0,039)	0,207 (0,024)	0,222
X10	(AGC) <sub>6</sub> C	0,217 (0,035)	0,168 (0,023)	0,229
M27	(GA) <sub>8</sub> C	0,330 (0,028)	0,254 (0,016)	0,229
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	0,351 (0,012)	0,256 (0,010)	0,270
На общую выборку		0,291 (0,030)	0,221 (0,019)	0,239

Примечание:  $H_T$  – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов как мера общего генного разнообразия во всей популяции;  $H_S$  – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в субпопуляции, как мера ее внутривидового разнообразия или среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам;  $G_{ST}$  – доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения

На дендрограмме (рисунок) популяции  $Pn\_2$  «Бирск» и  $Pn\_3$  «Стерлитамак» образуют один кластер, к ним примыкает популяция  $Pn\_4$  «Инзер», в свою очередь,  $Pn\_1$  – «Спасская гора», самая северная из изученных популяций, представлена отдельной ветвью.



UPGMA-дендрограмма по ISSR-спектрам четырех изученных популяций *P. nigra*, где  $Pn\_1$  – «Спасская гора»,  $Pn\_2$  – «Бирск»,  $Pn\_3$  – «Стерлитамак»,  $Pn\_4$  – «Инзер»; шкала сверху – генетические дистанции по формуле М. Нея, В. Ли [10], цифрами указаны значения бутстреп

Анализ генетической структуры и дифференциации популяций тополя чёрного на основании полиморфизма SSR-PCR-маркеров показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей популяции ( $H_T$ ) равна 0,759, аналогичный показатель в субпопуляции ( $H_S$ ) составляет 0,615. Показатель подразделённости популяций ( $G_{ST}$ ) равен 0,168. Следовательно, 16,8% генетического разнообразия приходится на межпопуляционную компоненту, а 83,2% - на внутривидовую [3].

На основании результатов выполненного исследования для сохранения и возобновления генетических ресурсов *P. nigra* можно рекомендовать третью популяцию ( $Pn_3$ ), произрастающую вблизи г. Стерлитамак, обладающую наиболее высокими показателями генетического разнообразия ( $H_E=0,233$ ;  $n_e=1,425$ ;  $R=2$ ). При отборе деревьев для лесовосстановления необходимо учитывать их генотип, а также наличие редких ISSR-маркеров, которые наряду с другими молекулярными маркерами могут быть использованы и для идентификации популяций. Для сохранения генетического разнообразия тополя чёрного на популяционном уровне необходимо учитывать генетическую структуру популяций и уровень внутри- и межпопуляционной дифференциации. В целях сохранения генетического разнообразия популяции  $Pn_1$  ( $H_E=0,187$ ;  $n_e=1,302$ ;  $R=0$ ), расположенной в историко-природном комплексе «Спасская гора» в зоне островной Кунгурской лесостепи на Среднем Урале, а также  $Pn_4$ , произрастающей на территории Южно-Уральского заповедника в горном районе Южного Урала, необходимо соблюдение мер охраны, предусмотренных статусом ООПТ.

### **Заключение**

В ходе исследований генетического полиморфизма популяций *P. nigra* с применением ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК было установлено, что вид характеризуется высокой долей полиморфных локусов ( $P_{95}=0,878$ ), но средними значениями ожидаемой гетерозиготности ( $H_E=0,221$ ) и эффективного числа аллелей ( $n_e=1,494$ ). Самые высокие показатели доли полиморфных локусов ( $P_{95}=0,788$ ), значения эффективных аллелей ( $n_e=1,425$ ) и ожидаемой гетерозиготности ( $H_E=0,233$ ) отмечены в популяции  $Pn_3$  в окрестностях г. Стерлитамак. А популяция  $Pn_1$  на территории ООПТ «Спасская гора» обладает самым низким значением ожидаемой гетерозиготности ( $H_E=0,187$ ), а также эффективных аллелей ( $n_e=1,302$ ). Низкая доля полиморфных фрагментов ( $P_{95}=0,725$ ) отмечена в популяции  $Pn_4$  на территории Южно-Уральского заповедника вблизи г. Инзер. Установлено, что все изученные популяции *P. nigra* характеризуются средним уровнем генетической подразделённости ( $G_{ST}=0,239$ ). На основании полученных результатов даны

рекомендации по сохранению генетического разнообразия популяций *P. nigra* на Среднем и Южном Урале. Изучение генетической изменчивости природных популяций древесных растений может быть использовано для составления генетически обоснованных программ по сохранению, восстановлению и рациональному использованию лесных генетических ресурсов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке задания 2014/153 государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России (проект 144, № гос. рег. 01201461915).*

### Список литературы

1. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края : монография. – Пермь : Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2013. – 223 с.
2. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. – М. : Наука, 2004. - 619 с.
3. Мартыненко Н.А. Генетическая дифференциация на основании полиморфизма микросателлитных маркеров популяций тополя чёрного на Среднем и Южном Урале / Н.А. Мартыненко, А.Р. Ахметов, С.В. Боронникова и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17. – № 5. – С. 149-154.
4. Светлакова Т.Н. Эколого-генетический анализ популяционной структуры *Populus tremula* L. в Пермском крае / Т.Н. Светлакова, И.В. Бобошина, С.В. Боронникова и др. // Экологическая генетика. – 2012. – Вып. 3. – С. 43-47.
5. Скворцов А.К. Полиморфизм бальзамических тополей (*Populus* L., секция *Tacamahaca*) по данным ISSR маркирования / А.К. Скворцов, С.С. Беэр, И.А. Шанцер // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. – 2010. – С. 76-77.
6. Association genetics of chemical wood properties in black poplar (*Populus nigra*) / F.P. Guerra [et al.] // New Phytologist. – 2013. – Т. 197. – №. 1. – P. 162-176.
7. Association genetics of traits controlling lignin and cellulose biosynthesis in black cottonwood (*Populus trichocarpa*, *Salicaceae*) secondary xylem / J.L. Wegrzyn, A.J. Eckert, M. Choi // New Phytol. – 2010. – V. 188 (2). – P. 515.
8. Heinze B. Analysis of Variation in Chloroplast DNA Sequences / B. Heinze, A. Koziel-Monte, D. Jahn // Methods in molecular biology: Methods and Protocols. – 2014. – V. 1115. – P. 85-120.
9. Jansson S. Genetics and genomics of *Populus*: Crops and Models / R.P. Bhalerao, A.T. Groover. – New York : Springer, 2010. - P. 3-7.

10. Nei M. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases / M. Nei, W.-H. Li // Proceedings the National Academy Sciences. USA. – 1979. – № 76. – P. 5269-5273.
11. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 1, № 19. – P. 69-76.
12. Smulders M.J. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.) / M.J. Smulders, M. Van Der Schoot, P. Arens // Molecular Ecology Notes. – 2001. – V. 1. – P. 188-190.
13. Tuskan G.A. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray) / Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S. // Science. – 2006. – V. 313. – P. 1596-1604.
14. Vanholme B. Breeding with rare defective alleles (BRDA): a natural *Populus nigra* L. HCT mutant with modified lignin as a case study / B. Vanholme, I. Cesarino, G. Goeminne // New Phytol. – 2013. – V. 198 (3). – P. 765-776.
15. Wan X.Q. Study of genetic relationships and phylogeny of the native *Populus* in Southwest China based on nucleotide sequences of chloroplast trnT–trnF and nuclear DNA / X.Q. Wan [et al.] // Plant systematics and evolution. – 2013. – T. 299. – №. 1. – P. 57-65.
16. 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.