

Пришнивская Я.В.<sup>1,2</sup>, Нечаева Ю.С.<sup>1,2</sup>, Красильников В.П.<sup>1</sup>, Боронникова С.В.<sup>1</sup><sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет  
E-mail: yana\_prishnivskaya@mail.ru<sup>2</sup>Естественнонаучный институт Пермского государственного национального  
исследовательского университета

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЧЕТЫРЕХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SILVESTRIS* L. НА ВОСТОКЕ РУССКОЙ РАВНИНЫ НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-МАРКЕРОВ

Для решения современных проблем сохранения и возобновления лесов необходима оценка биоразнообразия лесных экосистем, важным элементом которой является изучение генетического разнообразия популяций основных лесобразующих видов растений, одним из которых является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Популяционно-генетические исследования *P. sylvestris* проведены, большей частью, на основании данных изоферментного анализа, а с использованием анализа полиморфизма ДНК-маркеров, таких как ISSR-маркеры, исследования единичны и проведены только в искусственных насаждениях.

Молекулярно-генетический анализ проведен у четырех популяций *P. sylvestris* L., расположенных на востоке Русской равнины. Выявлено 125 ISSR-маркеров, из которых 120 являются полиморфными ( $P_{95} = 0,960$ ). Установлено, что изученные на востоке Русской равнины четыре популяции характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия ( $P_{95} = 0,960$ ;  $H_e = 0,159$ ;  $n_e = 1,543$ ), при этом наибольшие значения изученных параметров отмечены в популяции PsIV ( $P_{95} = 0,783$ ;  $H_e = 0,211$ ;  $n_e = 1,367$ ), а наименьшие – в PsIII ( $P_{95} = 0,553$ ;  $H_e = 0,101$ ;  $n_e = 1,157$ ). Изученные популяции сильно дифференцированы, так как на межпопуляционную компоненту приходится 50,14% генетического разнообразия. Исследование генетической структуры популяций с использованием программы STRUCTURE 2.3.4 выявило четкое соответствие между кластерами генотипов и изученными популяциями.

Таким образом, анализ полиморфизма ISSR-маркеров позволяет эффективно оценить генетическое разнообразие и дифференциацию *P. sylvestris*, что необходимо для рационального лесопользования.

**Ключевые слова:** генетическое разнообразие, полиморфизм ДНК, ISSR-маркеры, генетическая структура, *Pinus sylvestris* L.

Для решения современных проблем сохранения и возобновления лесов необходима оценка биоразнообразия лесных экосистем, важным элементом которой является изучение генофонда основных лесобразующих видов растений [1]. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – один из наиболее широко распространенных экономически важных лесобразующих видов растений России, играющий исключительно важную роль в формировании структуры и функций лесных экосистем [2]. Древесина высокого качества делает её ценным объектом для лесопромышленного комплекса. Однако, возрастающее число несанкционированных вырубок леса нарушает важную роль сосны обыкновенной в формировании структуры и функций лесных экосистем и наносит значительный ущерб бюджету Российской Федерации [3]. Популяционно-генетические исследования *P. sylvestris* проведены, большей частью, на основании данных изоферментного анализа, а с использованием анализа полиморфизма ДНК-маркеров, таких как ISSR-маркеры,

исследования единичны и проведены только в искусственных насаждениях. Молекулярно-генетический анализ *P. sylvestris* на основании полиморфизма ДНК-маркеров на востоке Русской равнины ранее не проводился [4]–[6].

### Материал и методы

Объектами исследований являлись четыре популяции *Pinus sylvestris* L. (*Pinaceae*): Северодвинская (PsI), Верхневелужская (PsII), Велужско-Вятская (PsIII), Волжско-Велужская (PsIV). Эти популяции были выделены на основании специфики географической изменчивости аллометрических индексов шишек [3]. Первая популяция расположена в бассейне р. Юг и р. Северной Двины, вторая – в верховьях р. Ветлуги, третья – в бассейне среднего течения р. Ветлуги, четвертая – в бассейне нижнего течения р. Ветлуги и левобережье р. Волги на участке от устья р. Ветлуги до г. Новочебоксарска.

Для проведения исследований собраны свежие вегетативные почки с 368 деревьев. Выбор-

ки располагались на расстоянии не менее 100 километров друг от друга, и в каждой из них был взят материал с 92 деревьев расположенных на расстоянии 100 метров. Выделение ДНК проводили по методике С. Роджерса [6], с небольшими модификациями [7].

Для определения генетического разнообразия был избран ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) [8] – метод выявления полиморфизма ДНК. Отбор праймеров осуществлялся по эффективности выявления полиморфизма ДНК [9]. Амплификацию проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) по стандартной для ISSR-метода программе [10].

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле, которые окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров опыт повторяли не менее трех раз.

Компьютерный анализ полученных данных проведен с помощью программы POPGENE 1.31 [11] и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 [12] для MS-Excel с определением: доли полиморфных локусов ( $P_{95}$ ) [13], абсолютного числа аллелей ( $n_a$ ), эффективного числа аллелей ( $n_e$ ) [14], ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) [15]. Для описания генетической структуры популяции были использованы следующие па-

раметры [16]: 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 ( $G_{ST}$ ).

Кластерный анализ исследуемых популяций *P. sylvestris* был проведен и с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 [17], которая использует методы Монте Карло по схеме марковской цепи (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), что позволяет минимизировать неравновесие Харди-Вайнберга и неравенство по сцеплению локусов в кластерном анализе индивидов [18]. Количество кластеров (K) находилось в диапазоне от 2 до 6. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [19] была использована веб-программа STRUCTURE Harvester [20].

### Результаты и обсуждение

В четырех популяциях *P. sylvestris* с использованием ПЦП с пятью эффективными ISSR-праймерами выявлены 125 ISSR-маркеров, из которых 120 ( $P_{95}=0,960$ ) являются полиморфными (табл. 1). Доля полиморфных локусов выше в популяции PsI ( $P_{95}=0,820$ ), а ниже – в PsII ( $P_{95}=0,549$ ). Отличие этого показателя, установленного в популяциях PsI и PsII, достоверно ( $F_{\text{опыт}}=8,085$ , что выше  $F_{\text{ст}}=1,96$ ).

Таблица 1. Характеристика ISSR-маркеров четырех популяций *P. sylvestris*

ISSR-маркеры и показатели/популяции	Число ISSR-маркеров в популяциях, амплифицированных праймерами						
	ISSR-1	CR-212	CR-215	M27	X10	На выборку	
	P	P	P	P	P	N	P
PsI	12 (0,857)	16 (0,800)	16 (0,842)	14 (0,778)	15 (0,833)	89	73 (0,820)
PsII	6 (0,400)	12 (0,667)	11 (0,611)	8 (0,571)	8 (0,471)	82	45 (0,549)
PsIII	8 (0,500)	10 (0,588)	10 (0,588)	7 (0,438)	12 (0,632)	85	47 (0,553)
PsIV	17 (0,944)	14 (0,824)	13 (0,813)	9 (0,563)	12 (0,750)	83	65 (0,783)
На общую выборку	21 (0,955)	23 (0,920)	23 (0,958)	25 (0,962)	28 (1,000)	125	120 (0,960)

Примечание: N – число ISSR-маркеров, P – число полиморфных ISSR-маркеров, в скобках указана доля полиморфных локусов; PsI – Северодвинская популяция, PsII – Верхневелужская популяция, PsIII – Велужско-Вятская популяция, PsIV – Волжско-Велужская популяция

Из 125 ISSR-маркеров 28 (22,4%) являются уникальными, представленными только в одной популяции, а 120 ISSR-маркеров (77,6%) являются общими для всех изученных популяций (табл. 1).

С помощью ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК в PsIV выявлено наибольшее число уникальных ISSR-маркеров – 17, характерных лишь для особей этой популяции. В популяции PsI выявлено 8 уникальных, а PsII и PsIII выявлено 2 и 1 уникальных ISSR-маркера соответственно (табл. 2).

Ожидаемая гетерозиготность ( $H_E$ ) на общую популяцию *P. sylvestris* составила 0,154. Этот показатель (табл. 2) наибольший в популяции PsIV ( $H_E = 0,211$ ), а наименьший – в популяции PsIII ( $H_E = 0,101$ ).

Абсолютное число аллелей на локус ( $n_a$ ) на общую популяцию составило 1,976. Этот параметр наивысший в популяции PsI, в популяции PsIII он наименьший. Эффективное число аллелей ( $n_e$ ) является функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на ло-

кус и выравненности частот аллелей и, таким образом, является мерой генетического разнообразия популяции или вида. Эффективное число аллелей на локус ( $n_e$ ) на общую выборку равно 1,543. Большее значение этого показателя отмечено в популяции PsIV, а наименьшее значение – в PsIII (табл. 2).

Анализ генетической структуры изученных популяций *P. sylvestris* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ) на общую выборку составила 0,318, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам ( $H_S$ ) равна 0,159 (табл. 3).

Наименьшие показатели доли гетерозиготных генотипов ( $H_S$ ) отмечены при ПЦР проб ДНК с праймером M27 ( $H_S = 0,125$ ), а самые высокие значения этого показателя отмечены при использовании в ПЦР праймера CR-215 ( $H_S = 0,178$ ).

Таким образом, изученные популяции *P. sylvestris* сильно дифференцированы, так как на долю межпопуляционной компоненты приходится 50,14% генетического разнообразия.

Таблица 2. Генетическое разнообразие изученных популяций *P. sylvestris*

Популяции / показатели	PsI	PsII	PsIII	PsIV	На общую выборку
$P_{95}$	0,820	0,549	0,553	0,783	0,960
$H_E$	0,201 (0,017)	0,122 (0,016)	0,101 (0,014)	0,211 (0,018)	0,159 (0,008)
$n_a$	1,608 (0,490)	1,384 (0,488)	1,368 (0,484)	1,560 (0,498)	1,976 (0,154)
$n_e$	1,336 (0,356)	1,205 (0,331)	1,157 (0,265)	1,367 (0,385)	1,543 (0,336)
$R$	8 (0,064)	2 (0,016)	1 (0,008)	17 (0,136)	28 (0,224)

Примечание:  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность;  $n_a$  – абсолютное число аллелей на локус;  $n_e$  – эффективное число аллелей на локус; у всех вышеуказанных параметров в скобках даны стандартные отклонения;  $R$  – число редких ISSR-маркеров, в скобках указана их доля от общего числа ISSR-маркеров

Таблица 3. Генетическая структура и межпопуляционная дифференциация четырех популяций *P. sylvestris*

ISSR-праймер	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
ISSR-1	0,319 (0,029)	0,164 (0,010)	0,486
CR-212	0,315 (0,020)	0,178 (0,012)	0,433
CR-215	0,337 (0,024)	0,178 (0,012)	0,4735
M27	0,311 (0,031)	0,125 (0,011)	0,596
X10	0,319 (0,025)	0,152 (0,011)	0,514
На общую выборку	0,318 (0,024)	0,159 (0,008)	0,5014

Примечание:  $H_T$  – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов как мера общего генного разнообразия во всей популяции;  $H_S$  – ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции, 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

Кластерный анализ невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA), выявил степень сходства исследуемых популяций по ISSR-спектрам (рис. 1). На дендрограмме выборки образовали три кластера: в первый входят популяции PsII и PsIII, к которому примыкает популяция PsI, а в дальнейшем и популяция PsIV. Наименьшее генетическое расстояние отмечено между популяциями PsII и PsIII ( $D=0,135$ ), а наибольшее – между популяциями PsII и PsIV ( $D=0,454$ ).

Кроме того, для описания генетической структуры и исследования соответствия между кластерами генотипов и группами популяций применялась программа STRUCTURE 2.3.4. [21] В ней реализован байесовский алгоритм кластеризации генотипов в  $K$  кластеров с учетом априорной информации о географическом положении рассматриваемых популяций. Для выбора оптимального  $K$ , где  $2 \leq K \leq 6$ , использовался логарифм правдоподобия  $\text{LnPD}$  с помощью on-line-приложения к программе STRUCTURE Harvester [22] в которой для определения наиболее вероятного числа генетических групп используется метод Evanno [19].

Анализ структуры распределения генотипов в программе STRUCTURE показывает, что

наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой популяции на четыре кластера ( $K=4$ ), соответствующим четырем группами генотипов (рис. 2).

Генетическая структура *P. sylvestris* выражена четко, большинство деревьев могут быть отнесены к одной из исследованных популяций с апостериорной вероятностью  $\geq 0,95$ , что говорит о значительном уровне дифференциации популяций.

### Заключение

Таким образом, молекулярно-генетические исследования на основе ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК показали, что изученные на востоке Русской равнины четыре популяции *P. sylvestris* характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия ( $P_{95}=0,960$ ;  $H_e=0,159$ ;  $n_e=1,543$ ), при этом наибольшие значения изученных параметров отмечены в популяции PsIV ( $P_{95}=0,783$ ;  $H_e=0,211$ ;  $n_e=1,367$ ), а наименьшие – в PsIII ( $P_{95}=0,553$ ;  $H_e=0,101$ ;  $n_e=1,157$ ).

Анализ генетической структуры четырех популяций *P. sylvestris* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ) на общую выборку составила 0,318, ожидаемая доля ге-

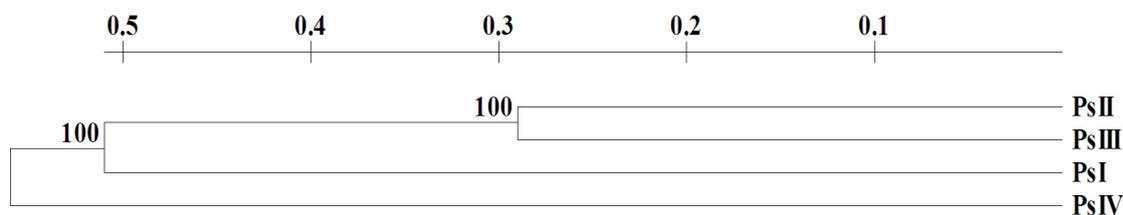


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная UPGMA-методом по ISSR-спектрам популяций *P. sylvestris*; шкала сверху – генетическое расстояние; на дендрограмме цифрами указаны значения бутстреп-поддержки (%); PsI, PsII, PsIII, PsIV – обозначения изученных популяций *P. sylvestris*

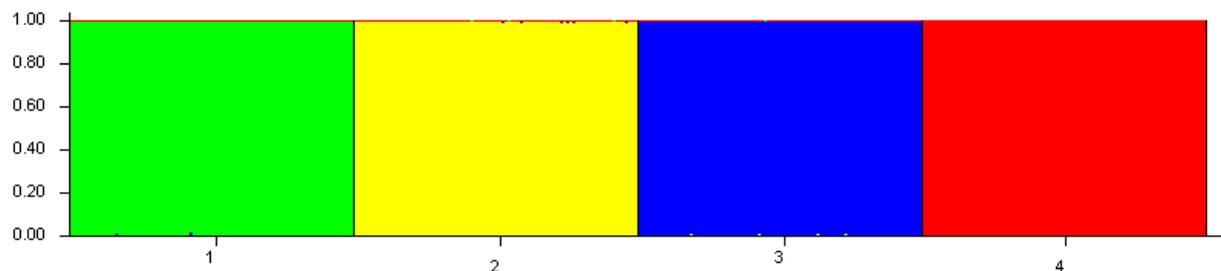


Рисунок 2. Структура распределения генотипов в популяциях *P. sylvestris* при  $K=4$ ; по вертикали – доля частот аллелей соответствующего кластера (апостериорная вероятность), по горизонтали – номера популяций

терозиготных генотипов в отдельной популяции по всем локусам ( $H_s$ ) равна 0,159, поэтому показатель подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) высок и составил 0,501. Изученные популяции сильно дифференцированы, так как на межпопуляционную компоненту приходится 50,14%

генетического разнообразия. Формирование кластеров на дендрограмме и распределение генотипов четырех изученных популяций в программе STRUCTURE показало четкую выраженность генетической структуры популяций *P. sylvestris*.

22.12.2015

**Работа выполнена при финансовой задания 214/153 государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания минобрнауки России (проект 144, №гос. рег. 01201461915)**

**Список литературы:**

1. Видякин А. И. Пространственная организация и факторы формирования групп популяций сосны обыкновенной в Южном Зауралье // А.И. Видякин, Г.Я. Кантор / Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – №10. – С. 34-39.
2. Тараканов В.В. Структура изменчивости, селекция и семеноводство сосны обыкновенной в Сибири. Дисс. .... д-ра с./х. наук. Новосибирск: Ин-т леса СО РАН, 2003. – 454 с.
3. Видякин А.И. Популяционная структура сосны обыкновенной на востоке европейской части России: Автореф. дис.... д-ра биол. наук. Екатеринбург, 2004. – 48 с.
4. Гончаренко Г.Г. Исследование генетической структуры и уровня дифференциации у *Pinus sylvestris* L. в центральных и краевых популяции Восточной Европы и Сибири // Г.Г. Гончаренко, А.Е. Силин, В.Е. Падутов / Генетика. – 1993. – Т. 29, №12. – С. 2019-2036.
5. Петрова Е. А. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций кедров сибирского на южной границе ареала в равнинной части Западной Сибири // Е. А. Петрова, С. Н. Велисевич, М. М. Белоконов, Ю. С. Белоконов, Д. В. Политов, С. Н. Горшкевич / Экологическая генетика. – 2014. – Т. XXII. №1. – С. 48-61
6. Rogers S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // S.O. Rogers, A.J. Bendich / Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 1. №19. – P. 69-76.
7. Нечаева Ю.С. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края // Ю.С. Нечаева [и др.] / Материалы международной конференции «Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование». – Пермь, 2011. – С. 278 – 282.
8. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda / Genomics. – 1994. – V. 20. – P. 176–183.
9. Боронникова С.В., Календарь Р. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости ресурсных и редких видов растений // Генетика. – 2010. – Т.46, №1 – С. 44-50 (Boronnikova, S.V., Kalendar', R.N. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants // Genetika – 2010 – 46 (1), – P. 44-50).
10. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края: монография. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. 223 с.
11. Yeh F.C. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / F.C. Yeh, R.C. Young, J. Mao et al. – Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton, Alta, 1999. – 238p.
12. Peakall R. GenA1Ex6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // R. Peakall, P.E. Smouse / Mol. Ecol. Not. – 2006. – V. 6. – P. 288-295.
13. Williams J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak et al. / Nucl. Acids Res. – 1990. – V. 18. – P. 6531–6535.
14. Kimura M. The number of alleles that can be maintained in a finite population // M. Kimura, J.F. Crow / Genetics (US). – 1964. – V. 49. – P. 725–738.
15. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics / M. Nei. – New York: Columbia University Press, 1987. – 512p.
16. Nei M. Molecular population genetics and evolution. / M. Nei. – Amsterdam, 1975. – 278 p.
17. Falush D. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies // D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard / Genetics. – 2003. – Vol. 164. – P. 1567–1587.
18. Smulders M.J.M. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.) // M.J.M. Smulders, J. van der Schoot, P. Arens / Mol. Ecol. Notes. – 2001. – Vol. 1. – P. 188–190.
19. Evanno G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet / Mol. Ecol. – 2005. – Vol. 14. – P. 2611–2620.
20. Earl A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // A. Earl, M. von Holdt / Conservation Genetics Resources. – 2012. – Vol. 4 (2). – P. 359–361.
21. Hubisz M.J. In ferring weak population structure with the assistance of sample group information // M.J. Hubisz, D. Falush, M. Stephens, J.K. Ritzhard / Mol. Ecol. Resources. – 2009. – V. 9, – P. 1322–1332.
22. Dent A.E., vonHoldt, (2012): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. // A.E. Dent, B.M. vonHoldt / Conservation Genetics Resources. – 2012. – №4 – P. 359–361.

**Сведения об авторах:**

**Пришнивская Яна Викторовна**, аспирант биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета, инженер-исследователь Естественно научного института Пермского государственного национального исследовательского университета  
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел. (3422) 2-396-729, e-mail: yana\_prishnivskaya@mail.ru

**Нечаева Юлия Сергеевна**, ассистент кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета, научный сотрудник Естественно научного института Пермского государственного национального исследовательского университета  
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел. (3422) 2-396-279, e-mail: yulianechaeva@mail.ru

**Красильников Виталий Павлович**, магистрант биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета,  
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, e-mail: trait969@gmail.com

**Боронникова Светлана Витальевна**, заведующий кафедрой ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета, заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной биологии и генетики Естественно научного института Пермского государственного национального исследовательского университета, доктор биологических наук, профессор  
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел. (3422) 2-396-279, e-mail: svboronnikova@yandex.ru