

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СТРУКТУРЫ НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB. НА УРАЛЕ СПОМОЩЬЮ SSR-МАРКЕРОВ

Ю. С. НЕЧАЕВА, Е. В. ЧУМАК, М. Ю. АНДРИЯНОВА

Пермский государственный национальный исследовательский университет

E-mail: yulianechaeva@mail.ru

Для сохранения и рационального использования лесных ресурсов необходимо глубокое изучение их генофондов. Одним из инструментов изучения генетических процессов являются молекулярно-генетические маркеры [2]. Особенно большое значение их использование приобрело у лесообразующих видов хвойных растений, которые обладают большим периодом онтогенеза, что затрудняет применение традиционных генетических методов [3]. Одними из ценных и широко распространенных хвойных видов растений России являются виды рода *Larix* Mill, имеющие огромное экологическое и экономическое значение. На Урале род *Larix* представлен лиственницей сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающей как в горных, так и в равнинных областях региона.

Целью данной работы явился анализ генетического разнообразия и структуры популяций лиственницы сибирской, произрастающей в равнинных и горных районах Урала, с помощью микросателлитных маркеров ядерной ДНК.

Объектами исследования служили выборки из 4 популяций *L. sibirica*, две из которых (Ls\_1 и Ls\_2) расположены в горах Северного Урала на высоте 500–900 м над уровнем моря, а две другие (Ls\_3 и Ls\_4) на равнинном плато (200–250 м над уровнем моря). Выделение тотальной ДНК проводилось из хвои с помощью СТАВ-метода [4]. Рабочая концентрация ДНК составляла 10 нг/мкл. Для амплификации 10 микросателлитных локусов мы использовали праймеры, разработанные и протестированные для лиственницы европейской в работе С. Вагнер с соавторами, где данные локусы показали себя как высокоинформативные для *L. decidua* и ряда других видов лиственницы [5]. Для проведения ПЦР использовался набор Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen), реакционная смесь содержала 2x Multiplex Mix, 0,2 мкМ каждого праймера и 10 нг геномной ДНК. Прямые праймеры несли флюорисцентную метку. Капиллярный электрофорез проведен на секвенаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter) в лаборатории отдела исследований генома Федерального научно-образовательного центра лесов, опасных природных явлений и ландшафта (BFW, г. Вена, Австрия). Компьютерный анализ полученных данных произведен с помощью программного обеспечения GenomeLab GeXP. Анализ генетического разнообразия и структуры популяций проведен в программе GenAlEx 6.5 и в пакете AMOVA (Analysis of Molecular Variance).

В результате молекулярно-генетического анализа 10 ядерных микросателлитных локусов *L. sibirica* установлено, что все исследованные локусы оказались полиморфными. У изученных локусов число выявленных аллелей варьировало от 6 до 26 (табл. 2). Всего при анализе 4 выборок было выявлено 116 аллельных вариантов микросателлитных локусов. Около 62 % выявленных аллелей оказались общими для всех выборок, а остальные 38 % уникальными. Анализ основных показателей генетического разнообразия (табл. 1) показал, что более высоким аллельным разнообразием ( $N_A = 8.000$ ) характеризовалась популяция Ls\_1, расположенная в горах Северного Урала. В целом основные показатели генетического

разнообразия популяций достаточно высоки, и эти данные согласуются с таковыми, приведенными в работах по изучению различных видов лиственниц Сибири, Дальнего Востока и Монголии с применением микросателлитных ядерных маркеров и изоферментов [1, 3]. Все изученные нами популяции *L. sibirica* обнаружили дефицит гетерозиготных генотипов. Наиболее высокие значения индекса фиксации ( $F$ ) выявлены также у популяции Ls\_1, а наименьшие – у популяции Ls\_3, произрастающей в равнинной местности Среднего Урала.

Таблица 1

Генетическое разнообразие горных и равнинных популяций *L. sibirica* на основании микросателлитного анализа

Популяция	$N$	$N_A$	$N_E$	$H_O$	$H_E$	$F$
<b>Горные популяции</b>						
Ls_1	30	8,000	4,338	0,503	0,708	0,287
Ls_2	30	6,100	3,433	0,503	0,614	0,164
<b>Равнинные популяции</b>						
Ls_3	30	7,300	3,885	0,594	0,609	0,038
Ls_4	24	5,800	3,595	0,579	0,652	0,111
Среднее		6,800±0,614	3,813±0,537	0,545±0,029	0,646±0,020	0,150±0,046

Примечание.  $N$  – число деревьев в выборке;  $N_A$  – среднее число аллелей на locus;  $N_E$  – эффективное число аллелей на locus;  $H_O$  – наблюдаемая гетерозиготность;  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность;  $F$  – индекс фиксации; ± – стандартная ошибка.

Таблица 2

Параметры генетической структуры и дифференциации четырех популяций *L. sibirica* по показателям  $F$ -статистики Райта

Лocus	Мотив	Число аллелей	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
Ld42	(TG)14	6	0,090	0,144	0,060
bcLK189	(AG)17AT(AG)6	11	0,076	0,119	0,046
bcLK253	(AG)17	6	0,270	0,296	0,035
Ld50	(CA)18	9	0,498	0,554	0,112
Ld56	(AC)16	10	0,264	0,310	0,064
bcLK228	(AG)18	12	0,053	0,100	0,050
bcLK211	(CT)16	7	0,110	0,153	0,048
Ld58	(AC)15	14	0,184	0,214	0,037
Ld101	(AC)12	15	0,029	0,070	0,042
bcLK263	(TC)20	26	0,051	0,092	0,043
Среднее ±			0,162±0,046	0,205±0,046	0,054±0,007

Примечание.  $F_{ST}$  – показатель генетической дифференциации популяций Райта;  $F_{IS}$  – показатель дефицита/избытка гетерозигот внутри популяций;  $F_{IT}$  – показатель дефицита/избытка гетерозигот между популяциями; ± – стандартная ошибка

Исследование популяционной структуры с помощью  $F$ -статистик Райта показало, что *L. sibirica* обнаруживает в среднем 16%-ный дефицит гетерозиготных генотипов ( $F_{IS} = 0,162$ ) внутри популяции и 20%-ный дефицит гетерозигот ( $F_{IT} = 0,205$ ) между популяциями (табл. 2). Только 5,4 % всей наблюдаемой изменчивости приходится на межпопуляционную компоненту.

Анализ молекулярных вариантов (AMOVA) подтвердил, что на межпопуляционную изменчивость приходится 5%, а остальные 95% изменчивости сосредоточено внутри популяций.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ 10 ядерных микросателлитных локусов позволил установить, что уровень генетического разнообразия у исследованных популяций *L. sibirica* из различных по экологическим условиям районов Урала достаточно высок ( $N_E = 3,813$ ,  $H_E = 0,646$ ), хотя и допускает небольшой дефицит гетерозигот ( $F = 0,150$ ). Горные популяции лиственницы сибирской характеризуются в среднем большими значениями индекса фиксации ( $F = 0,226$ ) в отличие от равнинных ( $F = 0,075$ ). Большая часть генетического разнообразия исследованных популяций *L. sibirica* приходится на внутрипопуляционную компоненту, тогда как межпопуляционная изменчивость составляет всего 5 %.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке задания 2014/153 государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части госзадания Минобрнауки России и средств Федерального научно-образовательного центра лесов, опасных природных явлений и ландшафта (BFW, Австрия). Авторы выражают озерную благодарность руководителю отдела исследования генома BFW доктору Бертольду Хайнце.*

#### Литература

1. Абаимов А. П., Адрианова И. Ю., Артюкова Е. В. [и др.]. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России. Новосибирск: ГЕО, 2010. 160 с.
2. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю. П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 619 с.
3. Орешкова Н. В., Белоконов М. М., Жамъянсурен С. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // Генетика. 2013. Т. 49, № 2. С. 204–213.
4. 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.
5. Wagner S., Gerber S., Petit R. J. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch) // Molecular Ecology Resources. 2012. №12. P. 717–724.

#### THE ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF SOME URAL POPULATIONS OF *LARIX SIBIRICA* LEDEB. BY USING SSR-MARKERS

YU. S. NECHAeva, E. V. CHUMAK, M. YU. ANDRIYANOVA

Perm State National Research University, Perm

**Summary.** Genetic diversity and structure of four populations *L. sibirica* of mountain and plain areas of the Urals has been studied using 10 pairs of nuclear microsatellite markers. 116 allelic variants were detected. According to the AMOVA results, inter-population variation to 5%, and the remaining 95% of the variability is concentrated within populations. The differentiation of four populations of larch based on SSR markers exceeded 16% ( $F_{IS} = 0.162$ ).