

УДК 58.009:582.475.4+575.22

О.В. Шейкина
Ю.Ф. Гладков
Т.Н. Криворотова

O.V. Shekina
Yu.F. Gladkov
T.N. Krivorotova

ISSR АНАЛИЗ ВЫБОРОК ДЕРЕВЬЕВ ИЗ НАСАЖДЕНИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В КОНТРАСТНЫХ ПОЧВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

ISSR ANALYSIS OF TREES FROM *PINUS SYLVESTRIS* L. STANDS GROWING UNDER CONTRAST SOIL CONDITIONS

Использован ISSR анализ для определения генетической изменчивости деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в контрастных почвенных условиях. Всего было амплифицировано 215 локусов с помощью шести ISSR – праймеров, из которых 201 локус были полиморфными. Были вычислены параметры генетической изменчивости и показан близкий уровень генетического разнообразия изученных деревьев. Эффективное число аллелей (N_e) на видовом уровне было 1.361, генетическое разнообразие по Неи (H) 0.231 и индекс Шеннона (I) 0.368.

Понимание того, как гетерогенность условий окружающей среды влияет на распределение генетической изменчивости среди природных популяций, является центральным вопросом эволюционной биологии и популяционной генетики (Гришина, 1985; Дворник и др., 1998; Manel et al., 2003; Anderson, 2010; Ларионова, Экарт, 2010; Salmela, 2011). Для изучения влияния гетерогенности почвенных условий на генетическую структуру и уровень генетической изменчивости насаждений сосны обыкновенной, был выполнен ISSR анализ выборок деревьев из трех насаждений, произрастающих в различных почвенных условиях на территории Республики Марий Эл. Первая выборка деревьев представлена образцами из сосняка брусничникового, произрастающего на свежих супесчаных почвах (Сбр). Вторая выборка представлена образцами из сосняка лишайникового, произрастающего на сухих песчаных почвах (Слш). Третья выборка представляет собой образцы, собранные в сосняке сфагновом, произрастающем на заболоченных почвах (Ссф).

Для изучения генетической структуры были использованы ISSR-PCR маркеры (Inter Simple Sequence Repeats). Экстракция ДНК производилась с использованием СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1991). Для ISSR анализа были использованы 6 праймеров: 5'-CACACACACAATGC-3'; 5'-CACACACACAAGG-3'; 5'-CACACACACACAGT-3'; 5'-CACACACACACAAC-3'; 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'; 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGGC-3'. ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с использованием коммерческого набора реактивов «Encyclo PCR kit» (Evrogen, Россия) объемом 10 мкл: 1 мкл ПЦР-буфера; 0,2 мкл 10Мм dNTPs; 0,1 мкл 100 мкМ праймера; 1 мкл образца ДНК; 0,1 мкл Taq-полимеразы (2 ед/мкл); 7,6 мкл воды. Режим ПЦР: 5 мин денатурация при 94 ° С (горячий старт), 0,5 мин денатурация при 94 ° С, 45 сек отжиг при 60 ° С, элонгация 45 сек при 72 ° С, 7 мин достройка при 72 ° С, 45 циклов амплификации. Детекцию продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в TBE буфере. Обработку данных проводили с использованием системы гель-документации GelDoc 2000 (Bio-Rad, США) и программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. ISSR профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Математическую обработку данных проводили методами популяционной генетики в программе POPGENE Version 1.32. Для определения генетических характеристик ценопопуляций сосны обыкновенной, сформированных в разных эдафических условиях были рассчитаны следующие параметры, характеризующие генетическую структуру: полиморфизм (P), эффективное число аллелей (N_e), общее генетическое разнообразие (H), информационный индекс Шеннона (I). Показатели были рассчитаны на основе анализа частоты встречаемости ISSR-фрагментов ДНК в разных ценопопуляциях.

В результате использования шести ISSR праймеров у всех исследованных выборок деревьев было обнаружено 215 амплифицированных фрагментов ДНК длиной от 200 до 25000 пар нуклеотидов, из которых 201 (93,5 %) были полиморфными (табл. 1).

Таблица 1

Показатели изменчивости выборок деревьев из насаждений сосны обыкновенной произрастающих в контрастных почвенных условиях

Насаждение	Показатели генетической изменчивости (среднее значение для всех локусов ± среднеквадратическое отклонение)			
	P, %	Эффективное число аллелей, Ne	Генетическое разнообразие по Нею, H*	Индекс Шеннона, I**
Сосняк брусничниковый	77,2	1,331 ± 0,33	0,207 ± 0,17	0,325 ± 0,25
Сосняк лишайниковый	67,9	1,289 ± 0,32	0,182 ± 0,17	0,287 ± 0,25
Сосняк сфагновый	79,3	1,299 ± 0,33	0,187 ± 0,17	0,298 ± 0,24
В целом для вида	93,5	1,361 ± 0,30	0,231 ± 0,16	0,368 ± 0,21

Примеч.: * Фактическое значение t-критерия Стьюдента 0,032–0,327, критическое значение 1,984 (P = 0,05);

** Фактическое значение t-критерия Стьюдента 0,026 – 0,251, критическое значение 1,984 (P = 0,05).

Сравнивая абсолютные значения показателей генетической изменчивости, можно отметить, что сосняк брусничниковый, произрастающий в наиболее оптимальных почвенных условиях, характеризуется более высоким генетическим разнообразием. Так, например, ожидаемая гетерозиготность (H) для сосняка брусничникового составила 0,207 против 0,182 и 0,187, которые были установлены для сосняка лишайникового и сфагнового соответственно. Однако, расчет критерия Стьюдента показал, что выявленные различия показателей генетической изменчивости не имеют достоверных различий, во всех вариантах сравнения фактический t-критерий оказался меньше критического значения. О незначительной генетической дифференциации также свидетельствуют относительно небольшие значения генетической дистанции Нея. Генетическая дистанция Нея составила между сосняком брусничниковым и сосняком лишайниковым 0,0695, между сосняком брусничниковым и сосняком сфагновым 0,0918 и между сосняком лишайниковым и сосняком сфагновым 0,0638.

Оценку уровня генетической дифференциации между сосновыми насаждениями можно также сделать на основе анализа доли межпопуляционного разнообразия (Gst). Значение доли межпопуляционного разнообразия отражает «баланс» процессов, вызывающих дифференциацию и интеграцию генофондов из разных популяций. Для изученных насаждений показатель Gst составил 0,169 и это свидетельствует о том, что на долю межпопуляционной изменчивости приходится только 16,9 % и большая часть (83,1 %) приходится на изменчивость деревьев внутри сравниваемых выборок.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные насаждения сосны обыкновенной в пределах одного географического региона (Республика Марий Эл), независимо от того, что они произрастают в контрастных почвенных условиях, не имеют существенной генетической дифференциации по ISSR-PCR маркерам. На наш взгляд полученные данные могут свидетельствовать о селективной нейтральности данного вида ДНК маркеров.

Работа выполнена в рамках Государственного задания высшим учебным заведениям на 2014 год «Изучение внутривидового полиморфизма сосны обыкновенной с использованием ISSR-маркеров» (№2713).

ЛИТЕРАТУРА

Гришина И.В. Изоляция и фенотипические различия смежных болотных и суходольных популяций сосны обыкновенной // Экология, 1985. – № 5. – С. 14–20.

Дворник В.Я., Котов В.С., Михеенко В.П. Генетическая дифференциация соседних популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в различных экотопах // Генетика, 1998. – № 9. – С. 1258–1263.

Ларионова А.А., Экарт А.К. Генетическое разнообразие и дифференциация болотных популяций сосны // Хвой-

ные бореальной зоны, 2010. – Т. XXVII, № 1–2. – С. 120–126.

Anderson C.D. Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow / Anderson C.D., Epperson B.K., Fortin M.J., Holderegger R., James P.M.A., et al. // *Mol Ecol.*, 2010. – № 19. – P. 3565–3575.

Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / Doyle J.J., Doyle J.L. // *Phytochemical Bulletin*, 1991. – № 19. – P. 11–15.

Manel S. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics / Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P. // *Trends Ecol Evol.*, 2003. – № 18. – P. 189–197.

Salmela M.J. Adaptive genetic variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland / Matti J. Salmela // PhD The University of Edinburgh, 2011. – P. 159.

SUMMARY

ISSR analysis was used to detect genetic variation among *Pinus sylvestris* L. trees growing under contrast soil conditions. A total of 215 loci were amplified by 6 ISSR – primers and 201 of them were polymorphic. Genetic variation parameters are calculated and the same genetic diversity level of the examined trees was shown. Effective number of alleles (N_e) in species level was 1.361, Nei's gene diversity (H) was 0.231 and Shannon's index (I) was 0.368.