

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ISSR-PCR АНАЛИЗА

Лисина А.Н.,

научный руководитель канд. биол. наук Ямских И.Е.

Сибирский федеральный университет

Лиственница - самая распространенная лесообразующая порода России, являющаяся важнейшим компонентом бореальных лесов Сибири, имеющих огромное экономическое и экологическое значение. От состояния этих лесов зависит климат на всей планете. В Сибири лиственница занимает 52% лесопокрытой площади. Широкое распространение лиственницы наглядно демонстрирует её хорошую приспособленность к различным условиям среды и в то же время предполагает её значительную видовую и внутривидовую генетическую дифференциацию (Абаимов, Милютин, 2005).

В исследованиях, связанных с молекулярным маркированием генома растений, хорошие результаты показывают методы полимеразной цепной реакции с ISSR, RAPD-праймерами. Эти методы отличаются относительной простотой. ISSR метод (Inter-Simple Sequence Repeats) анализирует анонимный полиморфизм ДНК, однако в отличие от RAPD, он хорошо воспроизводим. Для создания ISSR-маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. Метод может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования.

Целью данной работы было проведение анализа генетической структуры популяций лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающих на юге Красноярского края и в республике Хакасия при помощи ISSR-маркеров.

Работа произведена в отделе генетики и селекции "Центра защиты леса Красноярского края". Объектом исследований служили 5 популяций лиственницы: L1 – Богучанская, L2 – Ермаковская, L3 – Шушенская, L4 – Усть-Бюрская, L5 – Черное озеро. Из каждой популяции было проанализировано по 30 деревьев. Выделение ДНК производили из 15–25 мг сухой растительной ткани с помощью набора GenPak PCR Core (Isogen Lab, Moscow, Russia). Далее из имеющегося набора праймеров (Mansour et al., 2009; Paterson et al., 2009) опытным путем выявили 5 (HB9, HB11, UBC827, 17899A, 17899B), дающих воспроизводимый полиморфный результат. Данные праймеры могут быть рекомендованы для популяционно-генетических исследований лиственницы сибирской.

Аmplификацию проводили в 10 мкл смеси (5 мкл Diluent + 2,5 мкл Primer + 2,5 мкл ДНК) на амплификаторе Eppendorf с использованием реактивов производства ООО «Лаборатория Изоген» и ООО «СибЭнзим». Разделение продуктов амплификации производилось в 1.5% агарозном геле и 0,1 М ТБЕ-буфере при 250 В, 10Вт, 220мА в горизонтальной электрофорезной камере SE-2 компании ООО "Хеликон". После электрофореза гель окрашивали раствором 1% бромидом этидия в течение 20 мин. и фотографировали в проходящем УФ-излучении (рис.1).

ISSR-PCR анализом выявлено 46 амплифицированных фрагментов ДНК, процент полиморфизма которых суммарно составляет 91,3%, а генетическая изменчивость, определяемая с помощью индекса Шеннона, $H=0,38$. Размер фрагментов варьирует от 200 до 800 тпн (рис.1.).

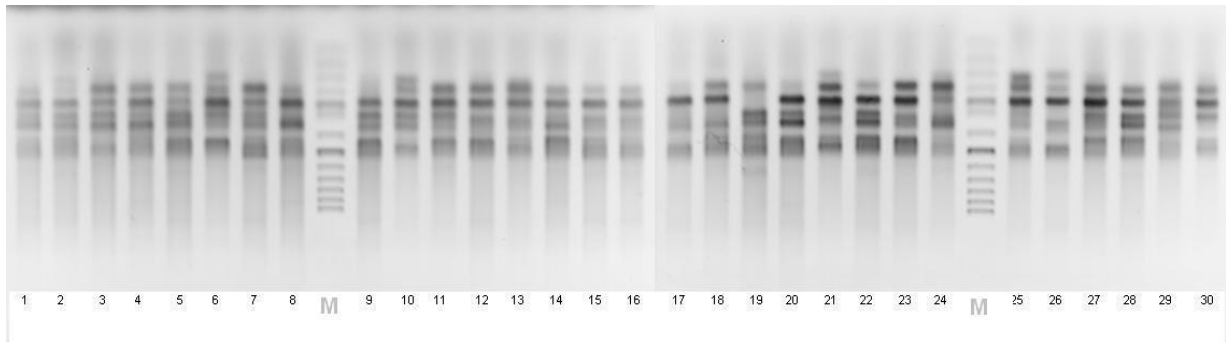


Рисунок 1 - Результат амплификации ДНК *Larix sibirica* (Богучанская популяция L1) с праймером UBC827: 1-30 – экземпляры лиственницы; М – маркер молекулярного веса.

Уровень выявляемого внутривидового полиморфизма амплифицированных фрагментов в целом достаточно высок (58,7-71,74%). Максимальные значения внутривидовой генетической изменчивости отмечены для Ермаковской популяции *Larix sibirica* L2 ($I=0,36$). Также достаточно высокими показателями полиморфизма характеризуются Богучанская (L1) и Шушенская (L3) популяции, где значения индекса Шеннона составляют 0,32. Хакасские популяции лиственницы (L4, L5) характеризуются относительно низкими показателями генетической изменчивости. Аналогичные результаты получены и при использовании другого показателя – коэффициента генетического разнообразия Нея (1973).

Анализ результатов межпопуляционной изменчивости показал высокую степень генетического сходства популяций друг с другом. Значения коэффициентов генетического сходства М.Нея (1972) варьируют от 0,91 до 0,96, при этом генетическое расстояние между популяциями минимально (0,04-0,09).

Дендрограмма сходства популяций построена с помощью программы TFPGA (UPGMA-тест) с использованием коэффициента Рейнольда с соавторами (1983) (рис.2). Наибольшее сходство отмечено между Богучанской (L1) и Шушенской (L3) популяциями лиственницы. Обособленное положение на дендрограмме занимает популяция L5 (Черное озеро, Хакасия), что, на наш взгляд, связано не с генетической обособленностью, а с низким качеством выделенной ДНК.

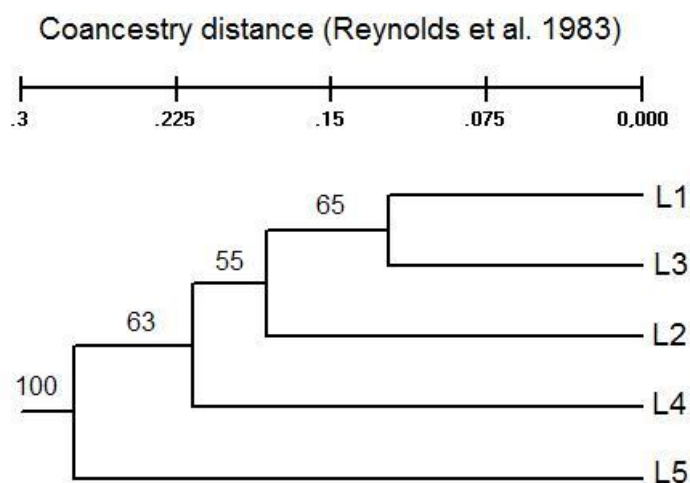


Рисунок 2 - Дендрограмма сходства популяций лиственницы сибирской на основе ISSR-анализа (UPGMA-тест): шкала сверху – генетические дистанции; на дендрограмме цифрами указаны значения бутстрепа (в %).

Научное исследование выполнено Сибирским федеральным университетом (проект «Генетические исследования лиственницы сибирской», № 4.4434.2011) в рамках Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на оказание услуг (выполнение работ).