

© Т. Н. Светлакова,
И. В. Бобошина,
С. В. Боронникова,
Ю. С. Нечаева

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ *POPULUS TREMULA L.* В ПЕРМСКОМ КРАЕ

ВВЕДЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

☼ **Широкое географическое и экологическое распространение тополя дрожащего или осины (*Populus tremula L.*) свидетельствует о ее высоком адаптационном потенциале. Проведен ISSR-анализ полиморфизма ДНК в семи природных популяциях в *Populus tremula L.* в Пермском крае. Выявлено 119 ISSR-маркеров, из которых 87 (73,1 %) полиморфны. Семь природных популяций *P. tremula* обладают различными уровнями генетического разнообразия, наблюдается высокий уровень генетической дифференциации в популяциях ($G_{ST} = 0,55$). Результаты исследования являются перспективными для разработки дальнейших программ разведения и сохранения ценных листовых древесных видов растений.**

☼ **Ключевые слова:** ISSR-маркеры; *Populus tremula L.*; генетическое разнообразие.

Род *Populus L.* стал модельным родом для лесной биологии и генетики благодаря относительно небольшому геному и огромным адаптивным возможностям (Genetics and Genomics..., 2010). Представители этого рода имеют широкое географическое распространение и являются одними из самых быстрорастущих древесных пород умеренной зоны Северного полушария (Brunner et al., 2004). В последние годы в Европе и в Америке интерес к исследованию и культивированию тополей сосредоточен на таких видах как *P. deltoides*, *P. nigra*, *P. trichocarpa* и их гибридах. В России, Казахстане, Крыму, Европе, Китае, Монголии и в Корее широко распространен тополь дрожащий или осина (*Populus tremula L.*). Высокая скорость роста, свойства древесины и форма дерева делают этот вид хорошим кандидатом для использования в лесопромышленном комплексе. Для разработки селекционных программ и сохранения биологического разнообразия *P. tremula*, необходимо изучить генетическую изменчивость и генетическую структуру природных популяций этого вида в различных ботанико-географических районах Пермского края.

Межмикросателлитный или ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)-анализ полиморфизма ДНК — это метод, обладающий хорошей воспроизводимостью, который может быть использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования (Zietkiewicz, 1994). Этот тип маркеров был успешно протестирован на нескольких видах рода *Populus*, исключая *P. tremula*. Кроме этого, ISSR-метод превзошел многие технические ограничения RFLP- и RAPD-методов (Gao et al., 2006).

Цель данной работы — молекулярно-генетический анализ семи популяций *P. tremula* в Пермском крае для определения состояния генофондов и дифференциации популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2007–2012 гг. было изучено семь популяций *P. tremula*, которые располагались в четырех из имеющихся шести (Овеснов, 1997) ботанико-географических районах Пермского края: *широколиственно-елово-пихтовых лесов* (Pt1 — первая популяция *P. tremula*, расположенная на территории Верхнее-Курьинского лесничества, Pt5 — пятая популяция, Чагинское лесничество); *среднетаежных пихтово-еловых лесов с преобладанием осиновых и березовых лесов* (Pt3, Добрянское лесничество) и *с преобладанием сельскохозяйственных земель* (Pt6, Чермоозское лесничество); *южнотаежных предгорных пихтово-еловых лесов* (Pt7, Губахинское лесничество); *островной Кунгурской лесостепи* (Pt2, Кунгурское лесничество, Pt4, Суксунское лесничество) (рис. 1).

Для молекулярно-генетического анализа в каждой популяции были собраны листья с 32 деревьев, расстояние между деревьями не менее 50 м. Наименьшее расстояние между популяциями — 40 км, среднее расстояние между популяциями — 125 км. Полиморфизм ДНК проанализирован у 224 отдельных деревьев. ДНК выделяли из 100 г листьев с использованием СТАВ-метода (Rogers et al., 1985) с небольшими модификациями. Концентрацию и спектральные характеристики ДНК определяли на приборе Spectrofotometr™

Поступила в редакцию 17.08.2012
Принята к публикации 20.09.2012

NanoDrop 2000 («Thermo scientific», USA). Тотальная ДНК была разбавлена до концентрации 10 нг/мкл в TE-буфере.

Молекулярно-генетический анализ проведен с использованием ISSR-метода. Амплификацию ДНК проводили в термощиклере Gene Amp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) по типичной для ISSR-метода программе (Молекулярная генетика., 2007). Каждый из 20-ти ISSR-праймеров был проанализирован индивидуально в ПЦР с геномной ДНК *P. tremula* и выявлены 5 эффективных праймеров (Светлакова и др., 2012). Последовательности праймеров представлены в таблице 1. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7% агарозном геле. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1,5 + 3 Kb DNA Ladder) (ООО «СибЭнзим-М», Москва).

Компьютерный анализ полиморфизма ДНК проведен с помощью программы POPGENE 1.32 (Yeh и др., 1997) и специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel (Peakall et al., 2006) с определением доли полиморфных локусов (P_{95}) (Williams et al., 1990), ожидаемой гетерозиготности (H_e) (Nei, 1987), числа редких аллелей (R), абсолютного числа аллелей (n_a), эффективного числа аллелей (n_e) (Kimura et al., 1964). Для описания генетической структуры популяций *P. tremula* 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}) (Nei, 1975). Генетическое расстояние (D) между попу-

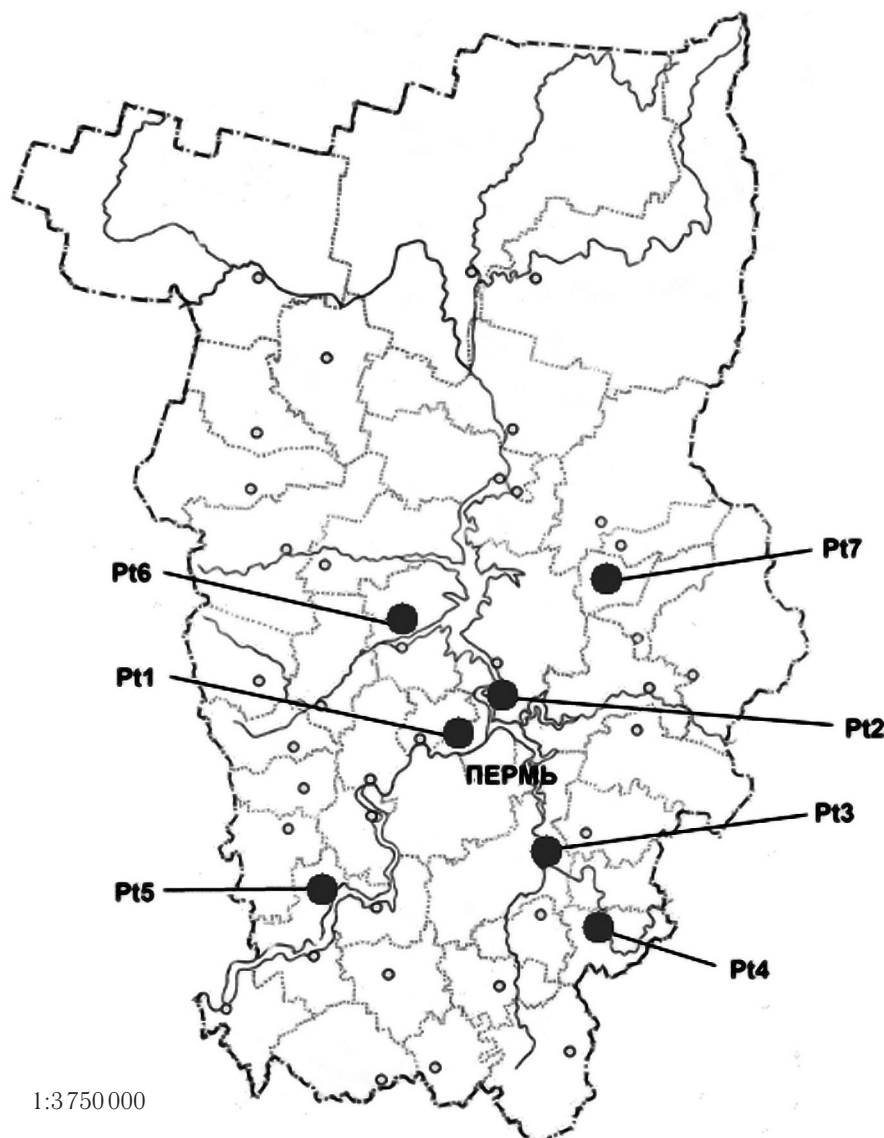


Рис. 1. Схема Пермского края с указанием расположения изучаемых популяций *P. tremula*. (Pt1, Pt2, Pt3, Pt4, Pt5, Pt6, Pt7 — обозначения популяций)

Таблица 1

Характеристика ISSR-праймеров, используемых в анализе ДНК *P. tremula*

ISSR-праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига (°C)	Длина фрагментов, пн	Число полиморфных фрагментов ДНК							Число фрагментов на общую выборку	
				Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	учитываемых	полиморфных
M1	(AC) ₈ CG	56	200–2560	10 (0,625)	11 (0,733)	14 (0,933)	10 (0,833)	9 (0,500)	14 (0,933)	13 (0,929)	27	22 (0,815)
M27	(GA) ₈ C	56	200–2470	5 (0,333)	16 (0,889)	7 (0,500)	14 (0,933)	12 (0,667)	5 (0,556)	4 (0,444)	23	13 (0,565)
X9	(ACC) ₆ G	64	280–1580	4 (0,364)	7 (0,875)	10 (0,667)	6 (0,545)	1 (0,200)	2 (0,250)	7 (0,700)	24	16 (0,667)
X10	(AGC) ₆ C	63	200–2570	9 (0,629)	5 (0,500)	12 (0,750)	12 (0,800)	5 (0,833)	13 (0,867)	8 (0,727)	26	21 (0,808)
X11	(AGC) ₆ G	64	150–2000	7 (0,636)	12 (0,857)	12 (0,800)	7 (0,778)	8 (0,533)	6 (0,750)	3 (0,750)	19	15 (0,789)
Всего				35 (0,530)	51 (0,785)	55 (0,733)	49 (0,790)	35 (0,565)	40 (0,727)	35 (0,686)	119	87 (0,731)

Примечание: в скобках указаны доли полиморфных фрагментов от общего числа фрагментов; Pt1, Pt2, Pt3, Pt4, Pt5, Pt6, Pt7 — обозначения популяций

ляниями определено по формуле М. Нея (Nei, 1979). На основе матриц бинарных признаков были рассчитаны матрицы генетических различий (Nei, 1972). По матрице генетических различий невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA — unweighed pair-group method using arithmetic average) были построены дендрограммы, отражающие степень родства исследуемых популяций по ISSR-спектрам при помощи компьютерных программ Treecon 1.3b и POPGENE 1.32.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В семи популяциях *P. tremula* было детектировано 119 ISSR-маркеров ДНК, из которых 87 были полиморфными (табл. 1). Среднее число фрагментов, выявляемых одним праймером, составило 23,8, максимальное — 27 (праймер M1), а минимальное — 19 (праймер X11) (рис. 2). Доля полиморфных локусов (P_{95}), полученных в результате ПЦП со всеми ISSR-праймерами,

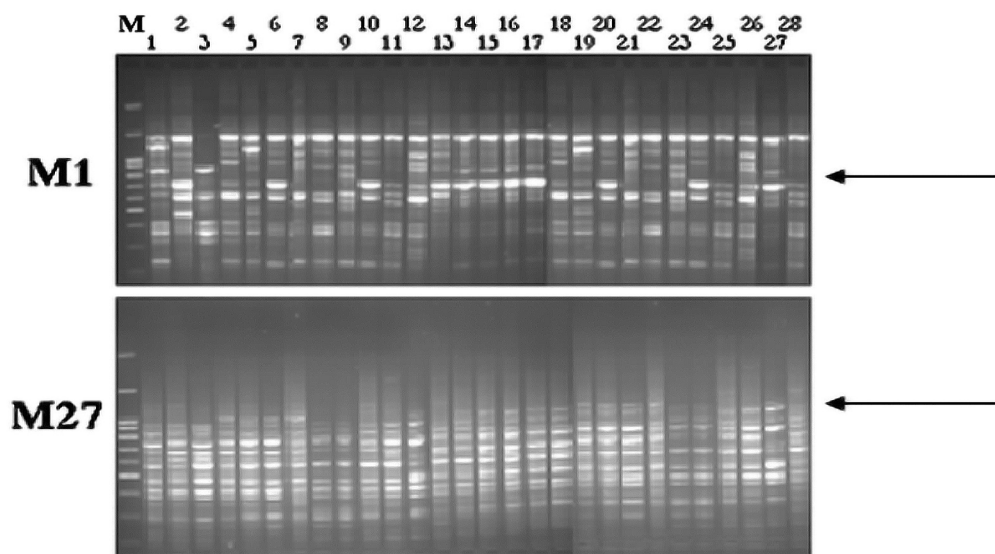


Рис. 2. ISSR-спектр популяции *P. tremula* (Pt1) с праймерами M1, M27; цифрами обозначены номера проб, М — маркер молекулярного веса, стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты

Таблица 2

Генетическое разнообразие популяций *P. tremula* на основании полиморфизма ISSR-PCR маркеров

	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7
H_E	0,139 (0,018)	0,160 (0,018)	0,142 (0,017)	0,138 (0,016)	0,120 (0,016)	0,114 (0,015)	0,088 (0,014)
n_a	1,345 (0,478)	1,465 (0,501)	1,417 (0,495)	1,449 (0,500)	1,323 (0,469)	1,354 (0,480)	1,315 (0,466)
n_e	1,248 (0,376)	1,275 (0,367)	1,239 (0,340)	1,225 (0,319)	1,204 (0,328)	1,186 (0,299)	1,141 (0,269)

Примечание: n_a — абсолютное число аллелей на локус; n_e — эффективное число аллелей на локус; H_E — ожидаемая гетерозиготность; в скобках даны стандартные отклонения.

составила 0,731. Этот показатель ниже в популяциях Pt1 и Pt5 ($P_{95} = 0,530$ и $P_{95} = 0,565$ соответственно). Доля полиморфных локусов, установленная с помощью разных праймеров, варьировала от 0,200 (праймер X9, популяция Pt5) до 0,933 (праймер M1, популяции Pt3, Pt6). Из 119 ISSR-маркеров 19 (15,97 %) были уникальными, представленные только в одной популяции, а 8 ISSR-маркеров (6,72 %) являются общими для всех исследованных популяций.

Самая распространенная мера генетической изменчивости в популяции — гетерозиготность. Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_E) на общую выборку составила 0,129 (табл. 2). Самая высокая ожидаемая гетерозиготность выявлена в популяции Pt2 ($H_E = 0,160$), самая низкая — в популяции Pt7 ($H_E = 0,088$). Наибольшее абсолютное число аллелей выявлено в популяциях Pt2 ($n_a = 1,465$) и Pt4 ($n_a = 1,449$). Эффективное число аллелей оказалось наибольшим в популяции Pt2 ($n_e = 1,275$). Наименьшие показатели абсолютного и эффективного числа аллелей отмечены в двух популяциях Pt6 ($n_e = 1,186$; $n_a = 1,354$) и Pt7 ($n_e = 1,141$; $n_a = 1,315$).

Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) *P. tremula* на общую выборку составила 0,281, а среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам (H_S) — 0,127 (табл. 3). Наименьшие показатели получены при анализе с праймером X9 ($H_T = 0,249$, $H_S = 0,080$),

а наибольшее — с праймером M27 ($H_T = 0,308$) и M1 ($H_S = 0,162$). Коэффициент подразделенности популяций (G_{ST}) показывает, что на межпопуляционную компоненту приходится 55 % генетического разнообразия ($G_{ST} = 0,550$). Наименьшее генетическое расстояние отмечено между популяциями Pt6 и Pt7 ($D = 0,089$), а наибольшее — между популяциями Pt1 и Pt6 ($D = 0,429$). На дендрограмме (рис. 3) изученные деревья *P. tremula* сформировали 7 кластеров, соответствующих исследованным семи популяциям.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные семь популяций *P. tremula* Пермского края характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия на основании полиморфизма ISSR-маркеров.

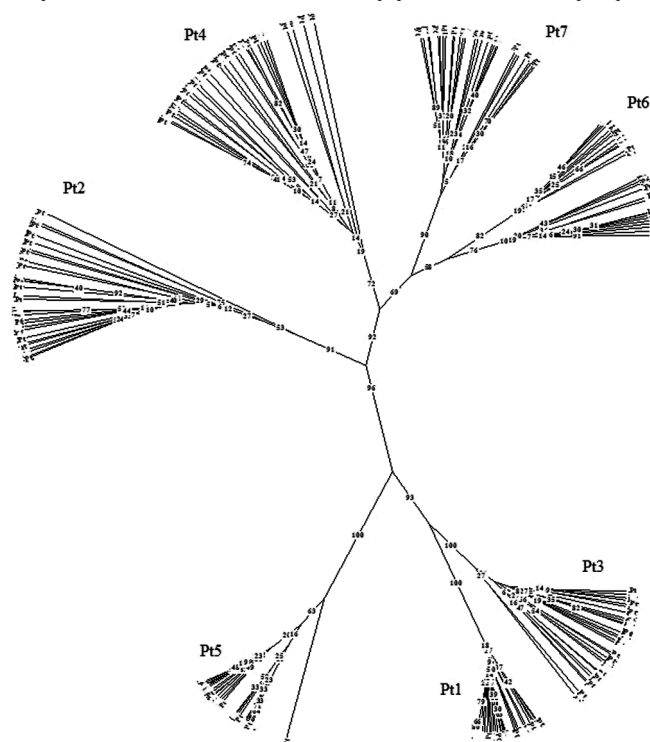


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма генетического сходства популяций *P. tremula*, построенная на основании полиморфизма ISSR-маркеров. Шкала сверху — генетические дистанции. На дендрограмме указаны значения бутстрепа (в %)

Таблица 3

Генетическая структура *P. tremula* в Пермском крае

ISSR-праймер	H_T	H_S	G_{ST}
M1	0,285 (0,023)	0,162 (0,012)	0,432
M27	0,308 (0,025)	0,147 (0,006)	0,521
X9	0,249 (0,036)	0,080 (0,005)	0,681
X10	0,296 (0,030)	0,130 (0,006)	0,559
X11	0,265 (0,035)	0,117 (0,006)	0,557
На общую выборку	0,281 (0,030)	0,127 (0,007)	0,550

Примечание: H_T — общее генное разнообразие в суммарной выборке; H_S — среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам; G_{ST} — показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения

Доля полиморфных локусов составила 73,1 %, а средняя ожидаемая гетерозиготность 0,129. Эти показатели подтверждают предположение о том, что широко распространенные виды поддерживают более высокий уровень генетического разнообразия, чем редкие виды (Каггон, 1987). Для этого вида, по литературным данным, показатели ожидаемой гетерозиготности варьируют от 0,026 до 0,834 (Lexel et al., 2005). Для двуаллельных локусов, к которым и относятся выявленные ISSR-методом данные, средняя ожидаемая гетерозиготность составляет 0,122. Таким образом, ожидаемая гетерозиготность изученных популяций *P. tremula* в Пермском крае выше среднего для этого вида.

В нашем исследовании популяции *P. tremula* в Пермском крае показали значительный уровень генетической дифференциации, большая доля разнообразия приходится на межпопуляционную компоненту ($G_{ST} = 0,550$). Это характерно для видов, интенсивно размножающихся вегетативным путем, к которым относится и *P. tremula*. При сравнении уровень генетической дифференциации изученных популяций *P. tremula* был значительно выше, чем у других видов тополя, исследованных с помощью AFLP (Chen, 2010) и SSR-маркеров (Wang., 2011; Li et al., 2006).

Генетические расстояния (D) между изученными популяциями *P. tremula* варьируют от 0,089 (между Pt6 и Pt7) до 0,429 (между Pt1 и Pt6). Изученные 224 дерева распределились на дендрограмме в семь кластеров в строгом соответствии с семью природными популяциями, что подтверждает их обособленность и позволяет установить генетическое сходство как между отдельными деревьями, так и изученными популяциями (рис. 3).

Наименьшая доля полиморфных локусов зафиксирована в популяциях Pt1 и Pt5, которые находятся на территории широколиственно-елово-пихтовых лесов ($P_{95} = 0,530$ и $P_{95} = 0,565$ соответственно), а наибольшая — в популяциях Pt2 и Pt4, находящихся в островной Кунгурской лесостепи ($P_{95} = 0,780$ и $P_{95} = 0,790$ соответственно). Среднее выборочное генное разнообразие (H_S) по всем локусам оказалось максимальным для популяций островной Кунгурской лесостепи ($H_S = 0,159$), в то время как средний для всех популяций показатель равен 0,127. Расположение в ботанико-географическом районе не оказало влияния на генетические дистанции между популяциями. Например, наименьшие генетические расстояния оказались между популяциями Pt4, Pt6 и Pt7, которые располагаются в разных ботанико-географических районах. Таким образом, изученные популяции *P. tremula*, расположенные в разных ботанико-географических районах Пермского края, характеризуются различной генетической структурой популяций. Наши исследования подтвердили вывод (Chen et al., 2010) о том, что популяционная структура у *Populus* формируется под воздействием как генетических механизмов, так и других экологических, фитоценологических факторов и условий ботанико-географического района.

Установленные нами генетическая гетерогенность и высокий уровень генетической дифференциации изученных популяций *P. tremula* являются перспективными для разработки дальнейших программ разведения и сохранения ценных листовых древесных видов растений. Определение генетического разнообразия и генетической структуры природных популяций *P. tremula* может послужить основой для отбора модельных популяций и изучения генетической компоненты биологического разнообразия.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием на оказание услуг, частично финансируемых Министерством образования и науки РФ из средств федерального бюджета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Молекулярная генетика: учеб.-метод. пособие, 2007. Под ред С.В. Боронниковой. Пермь: Перм. ун-т. 150 с.
2. Овеснов С.А., 1997. Конспект флоры Пермской области. Пермь: Изд-во Перм. Ун-та. С. 82.
3. Светлакова Т.Н., Бобошина И.В., Нечаева Ю.С. и др., 2012. Генетическая дифференциация популяций *Populus tremula* L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров // Аграрный Вестник Урала. № 3 (95). С. 11–13.
4. Brunner A.M., Busov V.B., Strauss S.H., 2004. Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species // Trends in Plant Science. Vol. 9, № 1. P. 49–56.
5. Chen Ke, Peng Youhong, 2010. AFLP analysis of genetic diversity in *Populus Cathayana* Rehd originating from southeastern Qinghai-tibetan plateau of China. Pak. J. Bot., 42(1): 117–127.
6. Gao J., Zhang S., Qi L., Zhang Y., 2006. Application of ISSR-Markers to Fingerprinting of Elite Cultivars (Varieties/Clones) From Different Sections of the Genus *Populus* L. // Silvae Genetica. Vol. 55, N 1. P. 1–6.
7. Genetics and Genomics of *Populus*, 2010. Series: Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, Vol. 8/Jansson, Stefan; Bhalerao, Rishikesh; Groover, Andrew (Eds.). 1st Edition.
8. Karron J.D., 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners // Evol. Ecol. Vol. 1. P. 47–58.
9. Kimura M., Crow J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics (US). Vol. 49. P. 725–738.
10. Lexel C., Fay M.F., Joseph J.A et al., 2005. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression // Molecular Ecology. № 14. P. 1045–1057.

11. Li shifeng, Zhangbo, Chen yin et al., 2006. Analysis of Genetic Diversity of *Populus deltoides* gemplasm by SSRs. International poplar symposium. Nanjing, China.
12. Nei M., 1972. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. Vol. 106. P. 283–292.
13. Nei M., 1987. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. press, 512 p.
14. Nei M., 1975. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam. 278 p.
15. Nei M., Li W.-H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 76. P. 5269–5273
16. Peakall R., Smouse P.E., 2006. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Not. Vol. 6. P. 288–295.
17. Rogers S.O., Bendich A.J., 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. Vol. 5. P. 69–76.
18. Wang J., Wu Y., Ren G., Guo Q., Liu J. et al., 2011. Genetic Differentiation and Delimitation between Ecologically Diverged *Populus euphratica* and *P. pruinosa*. PLoS ONE 6(10): e26530. doi:10.1371 / journal.pone.0026530.
19. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. Vol. 18. P. 6531–6535.
20. Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H., Mao J.X., 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
21. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. Vol. 20. P. 176–183.

ECOLOGICAL AND GENETIC ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE OF *POPULUS TREMULA L.* IN PERM REGION

Svetlakova T.N., Boboshina I.V., Boronnikova S.V., Nechaeva Y.S.

✿ **SUMMARY:** The wide geographical and ecological distribution of aspens (*Populus tremula L.*) indicates its high adaptive potential. The ISSR-analysis of DNA polymorphisms in seven natural populations of *Populus tremula L.* (in the Perm region) was performed. Total of 119 bands were obtained of which 87 (73.1%) were polymorphic. Seven natural populations of *P. tremula* possess different levels of genetic diversity, and there was a high level of genetic differentiation between the populations ($G_{ST} = 0,550$). The results of the study are promising for development of further programs of cultivation and preservation of valuable deciduous tree species.

✿ **KEY WORDS:** ISSR-markers; *Populus tremula L.*; genetic diversity.

✿ Информация об авторах

Светлакова Татьяна Николаевна — аспирант биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». 614012, г. Пермь, Карпинского ул., д. 101? кв. 109. E-mail: atea2@yandex.ru.

Бобошина Ирина Викторовна — научный сотрудник Естественно-научного института ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». 614990, г. Пермь, Букирева ул., д. 15. E-mail: coccinella@yandex.ru.

Боронникова Светлана Витальевна — д. б. н., заведующая кафедрой ботаники и генетики растений биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». 614990, г. Пермь, Букирева ул., д. 15. E-mail: Svboronnikova@yandex.ru.

Нечаева Юлия Сергеевна — научный сотрудник Естественно-научного института ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет». 614990, г. Пермь, Букирева ул., д. 15. E-mail: yulianechaeva@mail.ru.

Svetlakova Tatyana Nikolayevna — aspirant. Perm State National Research University. 614012, Perm, Bukireva st., 15. E-mail: atea2@yandex.ru.

Boboshina Irina Viktorovna — scientist. Perm State National Research University. 614012, Perm, Bukireva st., 15. E-mail: coccinella@yandex.ru.

Boronnikova Svetlana Vitalyevna — D.Sc., Head of department of botany and genetics of plant. Perm State National Research University. 614012, Perm, Bukireva st., 15. E-mail: Svboronnikova@yandex.ru.

Nechayeva Yuliya Sergeevna — scientist. Perm State National Research University. 614012, Perm, Bukireva st., 15. E-mail: yulianechaeva@mail.ru.