

УДК 630\*232.311.3

*А. А. Прохорова, О. В. Шейкина, Ю. Ф. Гладков*

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВЕГЕТАТИВНЫХ ПОТОМСТВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ ЕЛИ НА АРХИВЕ КЛОНОВ В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ

*Проведены исследования плюсовых деревьев ели, отобранных в пяти географических районах ISSR-методом. С использованием 9 ISSR-праймеров всего было амплифицировано 168 фрагментов, из которых 163 оказались полиморфными. Было установлено, что изученные группы плюсовых деревьев отличаются по уровню генетической изменчивости: полиморфность варьирует от 55,4 до 91,1 %; наблюдаемое число аллелей от 1,554 до 1,911; эффективное число аллелей от 1,272 до 1,484; генетическое разнообразие по Nei от 0,168 до 0,286; индекс Шеннона от 0,261 до 0,433. Генетическое расстояние между группами плюсовых деревьев составило 0,0328 – 0,1195.*

**Ключевые слова:** ель гибридная (*Picea x fennica* (Regel) Kot.); плюсовые деревья; генетическая изменчивость; ISSR-маркеры.

**Введение.** Изучение популяционно-генетической структуры, внутривидового разнообразия и дифференциации популяций основных лесобразующих видов хвойных является одним из приоритетных направлений биологии. При этом большое внимание уделяется изучению генетического разнообразия, которое является компонентом общего биологического разнообразия и сохранение которого рассматривается наукой в качестве одной из важнейших проблем человечества [1].

Полученные материалы по исследованию генетических процессов, протекающих в природных популяциях, могут иметь не только теоретическое значение для познания закономерностей внутривидовой дифференциации и микроэволюции вида, но и позволяют разработать возможные пути сохранения генофонда и селекционного улучшения вида на популяционной основе [2, 3]. Особую актуальность в связи с этим имеет изучение внутривидовой изменчивости основных лесобразующих видов, к числу которых от-

носится ель, генетическое разнообразие которой остается малоизученным.

Научные основы мониторинга биоразнообразия и организации неистощительной эксплуатации лесных ресурсов требуют получения количественных оценок популяционно-генетических параметров, что возможно лишь на базе молекулярно-генетических маркеров. Изоферментные молекулярные маркеры продолжают оставаться одним из главных инструментов изучения популяционно-генетической структуры, внутри- и межвидовой дифференциации и гибридизации древесных растений. Несмотря на развитие методов анализа изменчивости ДНК, во всем мире с помощью изоферментов до сих пор получают значительную долю информации о состоянии генофонда хвойных и других древесных растений [4]. Так, с помощью этого метода была изучена генетическая изменчивость и дифференциация популяций ели сибирской в Западном Саяне [5], в Западном Забайкалье и Монголии [6], генетический поли-

морфизм популяций ели Европейского Севера [7], генетическая дифференциация ели европейской в контрастных экологических условиях на территории Московской области [8, 9]. Установлено, что произрастающая в Западном Саяне ель сибирская характеризуется достаточно высоким уровнем внутривидового и низким уровнем межвидового разнообразия [5], а существенные различия в генетической структуре между бурятскими и монгольскими популяциями обусловлены, по-видимому, значительной изоляцией монгольской популяции, приведшей к снижению уровня генетического разнообразия в этой популяции и формированию специфической генетической структуры, проявляющейся в утрате или значительном снижении частот аллелей, появлению новых аллелей, в том числе уникальных [6]. Северотаяжские популяции ели также характеризуются некоторой генетической неоднородностью [7].

Таким образом, многочисленные исследования разных видов ели на основе анализа изоферментных систем показывают существенную генетическую дифференциацию и неоднородность популяций в разных географических районах. В то же время, необходимо отметить, что в последние годы на смену изоферментным молекулярным маркерам приходят более информативные ДНК-маркеры, которые позволяют изучать непосредственный полиморфизм нуклеотидов ДНК. Разные виды ДНК-маркеров успешно применяются для изучения генетического разнообразия и дифференциации популяций древесных видов [10–15 и др.]. В том числе были проведены исследования ели сибирской в Пермской области, по результатам которых с помощью ISSR-маркеров определены показатели генетической гетерогенности и генетической структуры популяций *Picea obovata* [16]. Данные исследования показали высокий уровень полиморфизма ДНК в природных популяциях (70,15 %). Однако нами не были найдены данные об использовании ДНК-маркеров для изуче-

ния генетических характеристик плюсовых деревьев ели, отобранных в разных географических районах. Для разработки стратегии сохранения генетического разнообразия ели необходимо установить уровень генетического разнообразия, характерный для отобранных плюсовых деревьев, и степень генетической дифференциации групп плюсовых деревьев из разных географических районов.

**Цель работы** – изучить генетическое разнообразие и дифференциацию клонов плюсовых деревьев ели из разных географических районов.

**Материалы, методы и объект исследования.** Объектом исследования являются вегетативные потомства плюсовых деревьев ели, произрастающие на архиве клонов в Учебно-опытном лесхозе Республики Марий Эл. Архив клонов был создан в 1991 году прививкой черенков на шестилетние подвойные растения. На архиве представлены клоновые потомства плюсовых деревьев из Республики Марий Эл, Удмуртской Республики, Нижегородской, Кировской и Пермской областей Российской Федерации. На архиве произрастают клоновые потомства ели гибридной (финской) (*Picea x fennica* (Regel) Kom.), так как плюсовые деревья были отобраны в зоне интрогрессивной гибридизации ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) [17].

В качестве растительного материала, служащего источником ДНК, в эксперименте использовалась хвоя, которая была высушена при комнатной температуре. Выделение суммарной ДНК производилось по протоколу J.J. Doyle и J.L. Doyle [18]. Гомогенизация сухой хвои осуществлялась с применением гомогенизатора SpeedMill Plus (Analyticjena). Для анализа были взяты девять полиморфных ISSR-праймеров, рекомендованных для использования при идентификации плюсовых деревьев ели [19]. Характеристика использованных в эксперименте ISSR-праймеров приведена в табл. 1.

Таблица 1

## Характеристика ISSR- праймеров

Праймер	Секвиенс (5'-3')	Температура отжига, °С
(GA) <sub>9</sub> T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	65
(AC) <sub>8</sub> C	ACACACACACACACC	65
(CA) <sub>6</sub> RY	CACACACACAAGCT	60
(CA) <sub>6</sub> RG	CACACACACAAGG	60
(CA) <sub>6</sub> (GT)	CACACACACAGT	60
(CA) <sub>6</sub> (AC)	CACACACACAAC	60
(AG) <sub>8</sub> C	AGAGAGAGAGAGAGC	60
(GA) <sub>8</sub> T	GAGAGAGAGAGAGAT	60
(AG) <sub>8</sub> YT	AGAGAGAGAGAGAGGCT	65

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в следующих условиях: 1 мкл ПЦР-буфера; 0,2 мкл 10 Мм dNTPs; 0,1 мкл 100 мкМ праймера; 1 мкл образца ДНК; 0,1 мкл Taq-полимеразы (2 ед/мкл); 7,6 мкл воды; общий объем реакционной смеси 10 мкл. Для проведения реакции использовали коммерческий набор реактивов «Epcuro PCR kit» (ЗАО Евrogen). Амплификация ISSR-фрагментов проводилась при следующем режиме: 5 мин денатурация при 94°C, 0,5 мин денатурация при 94°C, 45 сек отжиг при 60–65°C, элонгация 45 сек при 72°C; 7 мин достройка цепей ДНК при 72°C, 45 циклов амплификации. Реакции проводили в тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл на амплификаторе MJ Mini<sup>TM</sup> Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD).

Анализ продукта ПЦР проводился при помощи электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле. Разделение амплифицированных фрагментов выполняли в электрофорезной камере PowerPac<sup>TM</sup> Universal (BIO-RAD) в TBE буфере (0,89 М Трис-ОН, 0,89 М борная кислота, 50 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия в течение 2,5–3 часов при напряжении электрического поля 70 V.

Визуализацию ДНК, обработку и анализ полученных изображений проводили с помощью системы гель-документация GelDoc 2000 (BIO-RAD) с использованием программного пакета Quantity One<sup>®</sup> Version 4.6.3. Наличие амплифицированных фрагментов ДНК в гелях установили по интенсивности окраски. Для дальнейшего

определения длины амплифицированных фрагментов ДНК в крайние дорожки геля вносили стандарт, в качестве которого служит ДНК-маркер с фрагментами известной длины. В исследованиях в качестве стандарта использовался ДНК-маркер 100bp+1.5kb+3kb (ООО «СибЭнзим»).

ISSR-профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле, соответствующих фрагментам определенной длины, и математически обрабатывались в среде POPGEN Version 1.3.2 [20]. На основании полученных данных рассчитывались относительные частоты фрагментов. Полученные частоты ISSR-фрагментов использовались для оценки основных параметров генетической изменчивости клоновых потомств плюсовых деревьев ели из разных областей России. Для этого были рассчитаны следующие параметры оценки генетической изменчивости: наблюдаемое число аллелей – Na, эффективное число аллелей – Ne, общее генетическое разнообразие по Nei – H, индекс Шеннона – I. Оценка генетической дифференциации изученных групп плюсовых деревьев проводилась на основе вычисления генетической дистанции Nei и построения дендрограммы.

**Результаты исследования.** По результатам ISSR-анализа ДНК, выделенной из хвои клоновых потомств плюсовых деревьев ели разного происхождения, было установлено, что 9 ISSR-праймеров позволяет определить 168 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 163 были полиморфными (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2

## Результаты ПЦР-анализа ДНК клонов плюсовых деревьев ели с ISSR-праймерами

Праймеры	Количество амплифицированных фрагментов ДНК	Длины амплифицированных фрагментов ДНК, п.н.
(GA) <sub>9</sub> T	20	200 - 2540
(AC) <sub>8</sub> C	5	470 - 950
(CA) <sub>6</sub> RY	18	210 - 1930
(CA) <sub>6</sub> RG	19	210 - 1480
(CA) <sub>6</sub> (GT)	20	300 - 2210
(CA) <sub>6</sub> (AC)	16	210 - 1710
(AG) <sub>8</sub> C	23	300 - 2120
(GA) <sub>8</sub> TC	26	260 - 2480
(AG) <sub>8</sub> YT	21	200 - 1980
Итого	168	200-2540

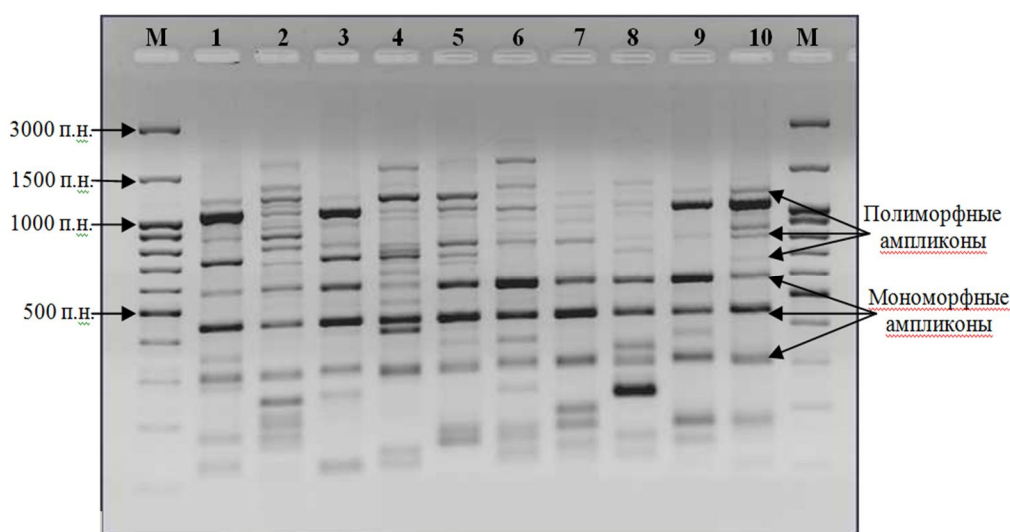


Рис. 1. Результаты ПЦР-детекции ДНК плюсовых деревьев ели с праймером (AG)<sub>8</sub>YT: 1-10 – номера анализируемых образцов; М – ДНК-маркер 100bp+1.5kb+3kb (СибЭнзим)

Число амплифицированных фрагментов ДНК в общей выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 5 у (AC)<sub>8</sub>C до 26 у (GA)<sub>8</sub>TC. В среднем при ISSR-анализе у ели один праймер инициировал амплификацию 19 фрагментов ДНК.

Доля полиморфных локусов в общей выборке в среднем составила 97,0 %, при этом в разных группах плюсовых деревьев данный показатель варьировал от 54,2 % в Пермской области до 91,1 % в Республике Марий Эл (табл. 3). Наблюдаемое число аллелей на локус (в нашем случае на фрагмент ДНК) для всех плюсовых деревьев составило 1,971, а эффективное чис-

ло аллелей на локус ( $N_e$ ) – 1,463. У плюсовых деревьев из Республики Марий Эл и Нижегородской области данные показатели оказались достаточно близкими к установленному видовому уровню. Так, наблюдаемое число аллелей составило 1,911 и 1,887, а эффективное число аллелей 1,441 и 1,484 в Республике Марий Эл и Нижегородской области соответственно. Для плюсовых деревьев из Удмуртской Республики, Пермской и Кировской областей было установлено более низкое аллельное разнообразие, наблюдаемое число аллелей варьировало от 1,542 до 1,577, а эффективное число аллелей от 0,272 до 1,341.

Таблица 3

## Основные показатели генетической изменчивости плюсовых деревьев ели

Происхождение	Поли-морфность, P, %	Наблюдаемое число аллелей, Na	Эффективное число аллелей, Ne	Генетическое разнообразие по Nei, H	Индекс Шеннона, I
Республика Марий Эл	91,1	1,911	1,441	0,270	0,418
Нижний Новгород	88,7	1,887	1,484	0,286	0,433
Удмуртская Республика	55,4	1,554	1,341	0,199	0,299
Кировская область	57,7	1,577	1,272	0,168	0,261
Пермская область	54,2	1,542	1,286	0,172	0,264
В целом по виду	97,0	1,970	1,463	0,283	0,439

Молекулярно-генетический анализ ДНК с использованием ISSR-метода показал, что самые высокие значения уровня генетического разнообразия наблюдаются у групп плюсовых деревьев из Республики Марий Эл и Нижегородской области, у которых уровень генетической изменчивости соответствует видовому уровню. Так, например, генетическое разнообразие по Nei (H) в целом для всех изученных плюсовых деревьев составило 0,283, в то время как у плюсовых деревьев из Республики Марий Эл – 0,270, а из Нижегородской области – 0,286. Для плюсовых деревьев из Удмуртской Республики, Пермской и Кировской областей был установлен более низкий уровень генетического разнообра-

зия. Для этих групп плюсовых деревьев генетическое разнообразие по Nei (H) находится в пределах от 0,168 до 0,199, а индекс Шеннона (I) от 0,261 до 0,299.

Коэффициент подразделенности популяций (Gst) показывает, что на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия ели приходится 21,5 % разнообразия, то есть изученные группы плюсовых деревьев сильно дифференцированы. Для оценки генетической дифференциации клоновых потомств плюсовых деревьев ели разного происхождения была рассчитана генетическая дистанция (табл. 4) и на основании невзвешенного парно-группового метода была построена дендрограмма (рис. 2).

Таблица 4

## Генетическая дистанция по Nei (под диагональю) и генетическая идентичность (над диагональю) клоновых потомств плюсовых деревьев ели разного географического происхождения

Популяция ID	Республика Марий Эл	Нижний Новгород	Удмуртская Республика	Кировская область	Пермская область
Республика Марий Эл		0,9677	0,8874	0,9329	0,9311
Нижний Новгород	0,0328		0,9045	0,9152	0,9213
Удмуртская Республика	0,1195	0,1003		0,8168	0,8241
Кировская область	0,0695	0,0886	0,2024		0,9580
Пермская область	0,0714	0,0820	0,1934	0,0430	

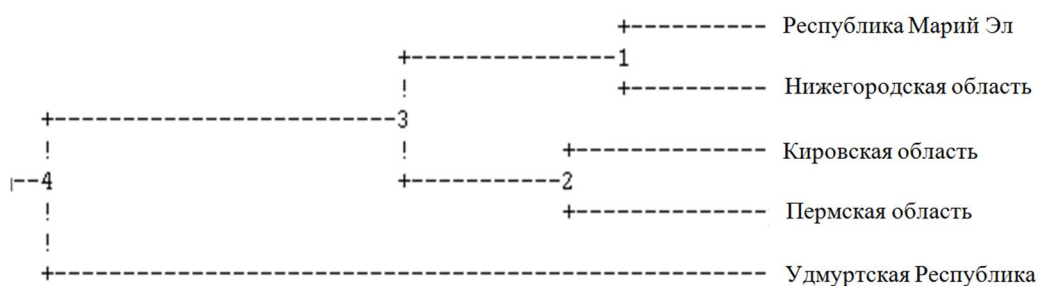


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции  $Nei$ , показывающая степень генетической дифференциации клоновых потомств плюсовых деревьев ели разного географического происхождения

Все пять происхождений ели генетически дифференцированы друг от друга, при этом наиболее генетически удаленными являются группы плюсовых деревьев из Республики Марий Эл и Удмуртской Республики (0,1195). Наименьшее генетическое расстояние наблюдается между деревьями ели из Республики Марий Эл и Нижегородской области (0,0328).

Дендрограмма показывает, что изученные группы плюсовых деревьев можно разделить на 3 кластера: 1 – плюсовые деревья из Республики Марий Эл и Нижегородской области; 2 – плюсовые деревья из Кировской и Пермской областей; 3 – плюсовые деревья из Удмуртской Республики. Однако, несмотря на то, что между изученными происхождениями были установлены генетические различия, из 168 полученных фрагментов ДНК не было выявлено ампликонов, присутствующих только в одной группе и отсутствующих в других.

Таким образом, вычисленные на основе ISSR-анализа значения генетических параметров позволяют говорить о том, что изученные плюсовые деревья ели отличаются по уровню генетического разнообразия и имеют существенную генетическую дифференциацию.

### Выводы

Исследования генетической изменчивости и дифференциации плюсовых деревьев ели из разных географических районов на основе ISSR-анализа позволяют сделать следующие выводы.

1. Девять ISSR-праймеров позволили выявить 168 фрагментов ДНК, 97,0 % из которых оказались полиморфными. Доля полиморфных локусов у групп плюсовых деревьев из разных географических районов варьировала от 54,2 до 91,1 %. Число амплифицированных фрагментов ДНК варьировало в зависимости от праймера от 5 у  $(AC)_8C$  до 26 у  $(GA)_8TC$ , длина полученных ампликонов от 200 до 2540 пар нуклеотидов.

2. Изученные группы плюсовых деревьев отличаются по уровню генетического разнообразия. Плюсовые деревья из Республики Марий Эл и Нижегородской области характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия. Для данных групп установлены значения генетических параметров, сопоставимые с видовым уровнем. Так, наблюдаемое число аллелей составило для этих происхождений 1,911 и 1,887 при общем значении по виду 1,97; эффективное число аллелей – 1,441 и 1,484 при общем значении по виду 1,463; генетическое разнообразие по  $Nei$  – 0,270 и 0,286 при общем значении по виду 0,283; индекс Шеннона – 0,418 и 0,433 при общем значении по виду 0,439. Для групп плюсовых деревьев из Удмуртской Республики, Пермской и Кировской областей установлено более низкое генетическое разнообразие: наблюдаемое число аллелей составило 1,554; 1,577 и 1,542; эффективно число аллелей – 1,341; 1,272 и 1,286; генетическое разнообразие по  $Nei$  – 0,199;

0,168 и 0,172; индекс Шеннона 0,299; 0,261 и 0,264 соответственно по регионам.

3. Генетическая дистанция между проанализированными группами плюсовых деревьев варьирует от 0,0328 до 0,1195, при этом наиболее генетически удаленными являются группы плюсовых деревьев из Республики Марий Эл и Удмуртской Республики, а наименьшее генетическое рас-

стояние наблюдается между плюсовыми деревьями ели из Республики Марий Эл и Нижегородской области. Проанализированные группы плюсовых деревьев можно разделить на 3 кластера: 1 – плюсовые деревья из Республики Марий Эл и Нижегородской области; 2 – плюсовые деревья из Кировской и Пермской областей; 3 – плюсовые деревья из Удмуртской Республики.

**Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.132.21.1331) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».**

### Список литературы

1. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях/ под ред. Ю. П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 619 с.

2. Путенихин, В. П. Популяционная структура и сохранение генофонда хвойных видов на Урале: Автореф. дисс. ...д-ра биол. наук. – Красноярск, 2000. – 48 с.

3. Ирошников, А. И. О концепции и программе генетического мониторинга популяций лесных древесных растений / А.И. Ирошников // Лесоведение. – 2002. – № 1. – С.58-64.

4. Политов, Д. В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. Pinaceae) Северной Евразии: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2007. – 47 с.

5. Кравченко, А. Н. Генетическая изменчивость и дифференциация популяций ели сибирской в Западном Саяне/А. Н. Кравченко, А. Я. Ларионова, Д. В. Политов, М. М. Белокопья, Ю. С. Белокопья// Вестник ТГУ. Приложение. – 2004. – № 10.– С. 38-40.

6. Кашапова, М. М. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций ели сибирской в Западном Забайкалье и Монголии//М. М. Кашапова, А. Н. Кравченко, А. К. Экрат, А. Я. Ларионова// Молодёжь и наука: Сборник материалов VIII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, посвященной 155-летию со дня рождения К. Э. Циолковского [Электронный ресурс]. — Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, 2012. <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/7842>.

### References

1. Dinamika populyatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeystviyakh [Dynamics of Population Genetic Fond under Anthropogenic Impact], Under the Editorship of Altukhov Yu.P.Moscow, Nauka Publ., 2004. 619 p.

2. Putenikhin V. P. Populyatsionnaya struktura i sokhranenie genofonda khvoynnykh vidov na Urale. Avto ref. diss.dokt. biol. nauk [Population Structure and Conservation of Genetic Fond of Coniferous Trees in the Ural Dr. biol. sci. diss]. Krasnoyarsk, 2000. 48 p.

3. Iroshnikov A. I. O kontseptsii i programme geneticheskogo monitoringa populyatsiy lesnykh drevesnykh rasteniy [On Conception and Program of Genetic Monitoring of Forest Species Populations]. Lesovedenie [Dendrology]. 2002. No1. P. 58-64.

4. Politov D. V. Genetika populyatsiy i evolyutsionnye vzaimootnosheniya vidov sosnovykh (sem. Pinaceae) Severnoy Evrazii. Avto ref. diss.dokt. biol. nauk [Population Genetics and Evolution Relationship of Pine Species (f. Pinaceae) in Northern Eurasia. Dr. biol. sci. diss]. Moscow, Vavilov Institute of General Genetics (Russian Academy of Sciences) 2007, 47 p.

5. Kravchenko A. N., Larionova A. Ya., Politov D. V., Belokon M. M., Belokon Yu. S. Geneticheskaya izmenchivost i differentsiatsiya populyatsiy eli sibirskoy v Zapadnom Sayane [Genetic Variation and Differentiation of Picea Obovata Population in Western Sayan]. Vestnik TGU [Vestnik of TGU]. 2004. No 10. P. 38-40.

6. Kashapova M. M., Kravchenko A. N., Ektrat A. K., Larionova A. Ya. Geneticheskoe raznoobrazie i differentsiatsiya populyatsiy eli sibirskoy v Zapadnom Zabaykale i Mongolii [Genetic Diversity and Differentiation of Picea Obovata Population in the West of Transbaikal and Mongolia]. Molodezh i nauka: Sbornik materialov VIII Vserossiyskoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh, posvyashchennoy 155-letiyu so dnya rozhdeniya K. E. Tsiolkovskogo [Youth and Science: Materials of VIII Russian Scientific and Technical

7. *Сурсо, М. В.* Генетический полиморфизм популяций хвойных Европейского Севера/М. В. Сурсо//Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11. – № 1 (3). – С. 389-393.

8. *Лебединская, Е. В.* Генетическая дифференциация ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. в контрастных экологических условиях на территории Московской области/Е. В. Лебединская, М. М. Белоконов, Ю. С. Белоконов, Е. А. Мудрик, Д. В. Политов//Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии в рамках фестиваля науки: тезисы докладов всероссийской молодежной конференции в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. – С. 16.

9. *Потенко, В. В.* Генетическая изменчивость и дифференциация популяций ели аянской на Сихотэ-Алине//В. В. Потенко, Ю. Д. Кныш // Лесоведение. – 2003. – № 4. – С.23-31.

10. *Mariette, S. P.* Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers // S. P. Mariette, D. Chagneat at al. // Heredity. – 2001. – Vol. 86. – 469-479.

11. *Яковлев, И.А.* Генетическая дифференциация дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в Европейской части России на основе RAPD-маркеров / И.А.Яковлев, Й. Клейншмит // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 2. – С.207-215.

12. *Semerikov, V.L.* Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species /V.L.Semerikov, M.Lascoux // Amer.J.Bot. – 2003. – Vol. 90, No 8. – P.1113-1123.

13. *Козыренко, М.М.* Генетическая изменчивость и взаимоотношения лиственниц Сибири и Дальнего Востока по данным RAPD-анализа / М.М. Козыренко, Е.В. Артбкова, Г.Д. Реунова и др. // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 4. – С.506-515.

14. *Семериков, С.А.* Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты си-

Conference for Students, Postgraduate Students and Young Researches, Dedicated to the 155th Anniversary of K. E. Tsiolkovskiy]. Krasnoyarsk, 2012. URL: <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/7842>.

7. *Surso M. V.* Geneticheskiy polimorfizm populyatsiy khvoynykh Evropeyskogo Severa [Genetic Polymorphism of the Conifers Population in the North of Europe]. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. [News of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences].2009. No1 (3). P. 389-393.

8. *Lebedinskaya E. V., Belokon M. M., Belokon Yu. S., Mudrik E. A., Politov D. V.* Geneticheskaya differentsiatsiya eli evropeyskoy *Picea abies* (L.) Karst. v kontrastnykh ekologicheskikh usloviyakh na territorii Moskovskoy oblasti [Genetic Differentiation of *Picea abies* (L.) Karst. in Contrast Ecological Conditions of Moscow Oblast]. Aktualnye problemy genetiki i molekulyarnoy biologii v ramkakh festivala nauki: tezisy докладов vsrossiyskoy molodezhnoy konferentsii v ramkakh federalnoy tselevoy programmy «Nauchnye i nauchno-pedagogicheskie kadry innovatsionnoy Rossii» na 2009-2013 gody [Actual Problems of Genetics and Molecular Biology within the Scientific Festival: Abstracts of Reports of Russian Conference for Young People within the Federal Target Program «Scientific and Pedagogic Personnel for Innovative Russia» for 2009-2013]. Ufa, 2012. P. 16

9. *Potenko V. V., Knysh Yu. D.* Geneticheskaya izmenchivost i differentsiatsiya populyatsiy eli ayanskoy na Sikhote-Aline [Genetic Variation and Differentiation of *Picea Jezoensis* Population on Sikhote-Aline]. Lesovedenie [Dendrology]. 2003. No 4. P. 23-31.

10. *Mariette, S. P.* Genetic Diversity within and among *Pinus Pinaster* Populations: Comparison between AFLP and Microsatellite Markers. Heredity. 2001. No. 86. P. 469-479.

11. *Yakovlev I.A., Kleynshmit Y.* Geneticheskaya differentsiatsiya duba chereschatogo (*Quercus robur* L.) v Evropeyskoy chasti Rossii na osnove RAPD-markerov [Genetic Differentiation of *Quercus robur* L. in the European Part of Russia with the Use of RAPD Marker]. Genetika [Genetics.]. 2002. No 32 (2). P. 207-215.

12. *Semerikov V.L.* Nuclear and Cytoplasmic Variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) Species. Amer.J.Bot. 2003. No. 90 (8). P. 1113-1123.

13. *Kozyrenko M.M., Artbkova E.V., Reunova G.D., etc.* Geneticheskaya izmenchivost i vzaimootnosheniya listvennits Sibiri i Dalnego Vostoka po dannym RAPD analiza [Genetic Variation and Relationship between *Larix* of Siberia and Far East Based on RAPD Analysis]. Genetika [Genetics]. 2004. No 40 (4). P. 506-515.

14. *Semerikov S. A., Semerikov V.L.* Izmenchivost khloroplastnykh mikrosatelitnykh lokusov u pikhty



бирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихт *A. nerhrolepis* (Trautv.) Maxim. и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt / Семериков С. А., Семериков В. Л. // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 12. – С. 1637-1646.

15. Новиков, П.С. Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной на архиве клонов по ISSR-маркерам / П.С. Новиков, О.В. Шейкина, Т.Н. Милютин // Вестник МарГТУ. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2011. – № 3. – С. 82-87

16. Нечаева, Ю.С. Молекулярно-генетические исследования *Picea obovata* Ledeb. в Пермском крае / Ю. С. Нечаева, Я. В. Пришневская, М. В. Рогозин, С. В. Боронникова // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии в рамках фестиваля науки: тезисы докладов всероссийской молодежной конференции в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2012. – С. 20.

17. Правдин, Л.Ф. Ель европейская и ель сибирская в СССР / Л.Ф. Правдин. – М.: Наука, 1975. – 150 с.

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

19. Шейкина, О. В. Разработка методики идентификации клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной (*Picea abies* L.) с использованием ISSR-маркеров / О. В. Шейкина, А. А. Прохорова, П. С. Новиков, Т. Н. Криворотова // Научный журнал КубГАУ. – № 82 (08). – 2012. – [Электронный ресурс]. -<http://ej.kubagro.ru/2012/09/21.pdf>

sibirskoy (*Abies sibirica* Ledeb.) i dvukh dalnevostochnykh vidov pikht (*A. nerhrolepis* (Trautv.) Maxim. i *A. sachalinensis* Fr. Schmidt) [Variation of Chloroplast Microsatellite Locus in Siberian Fir (*Abies sibirica* Ledeb.) and Two Far Eastern Types of Fir - (*A. nerhrolepis* (Trautv.) Maxim. and *A. sachalinensis* Fr. Schmidt)]. Genetika [Genetics]. 2007. No 43 (12). P. 1637-1646.

15. Novikov P.S., Shekina O.V., Milyutina T.N. Izmenchivost plyusovykh derevev sosny obyknovonnoy na arkhive klonov po ISSR markeram [Variation of Pinus Sylvestris Plus Trees on the Base of Clone Archives by ISSR Markers]. Vestnik MarGTU [Vestnik of MarSTU.]. 2011. No 3. P. 82-87.

16. Nechaeva Yu. S., Prishnevskaya Ya. V., Rogozin M. V., Boronnikova S. V. Molekulyarno-geneticheskie issledovaniya Picea obovata Ledeb. v Permskom krae [Molecular – Genetic Study of Picea Obovata Ledeb. in the Perm Region]. Aktualnye problemy genetiki i molekulyarnoy biologii v ramkakh festivalya nauki: tezisy докладов всероссийской молодежной конференции в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гody [Actual Problems of Genetics and Molecular Biology within Scientific Festival: Abstracts of the Reports of Russian conference for Young People within Federal Target Program «Scientific and Pedagogic Personnel for Innovative Russia» for 2009-2013]. Ufa, 2012. P. 20.

17. Pravdin L. F. El evropeyskaya i el sibirskaya v SSSR [European and Siberian Spruce in the USSR]. Moscow, Nauka Publ., 1975. 150 p.

18. Doyle J.J., Doyle J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. Phytochemical Bulletin. 1991. No 19. P. 11-15

19. Sheykina O. V., Prokhorova A. A., Novikov P. S., Krivorotova T. N. Razrabotka metodiki identifikatsii klonov plyusovykh derevev eli obyknovonnoy (*Picea abies* L.) s ispolzovaniem ISSR markerov [Developing of the Methodology for Identification of Picea abies L. Clones with the Use of ISSR Markers]. Nauchnyy zhurnal KubGAU [Scientific Journal KubGAU]. 2012. No 82(08). URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/21.pdf>

Статья поступила в редакцию 06.05.13.

**ПРОХОРОВА Александра Александровна** – аспирант кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет (Российская Федерация, Йошкар-Ола). Область научных интересов – селекция и лесное семеноводство ели. Автор 18 публикаций.

E-mail: [a\\_katavas@rambler.ru](mailto:a_katavas@rambler.ru)

**ШЕЙКИНА Ольга Викторовна** – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет (Российская Федерация, Йошкар-Ола). Область научных интересов – молекулярно-генетические исследования древесных видов, использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве, селекция древесных видов. Автор 34 публикаций.

E-mail: [SheykinaOV@volgatech.net](mailto:SheykinaOV@volgatech.net)

*ГЛАДКОВ Юрий Федорович* – аспирант кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет (Российская Федерация, Йошкар-Ола). Область научных интересов – молекулярно-генетические исследования древесных видов. Автор одной публикации.

E-mail: glakov\_yuriy@yandex.ru

*PROKHOROVA Alexandra Alexandrovna* – Postgraduate Student at the Chair of Forest Selection, Non-Woody Resources and Biotechnology, Volga State University of Technology (Russian Federation, Yoshkar-Ola). Research interests – selection and forest seedage of Spruce. The author of 18 publications.

E-mail: a\_katavas@rambler.ru

*SHEYKINA Olga Viktorovna* – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor at the Chair of Forest Selection, Non-Woody Resources and Biotechnology, Volga State University of Technology (Russian Federation, Yoshkar-Ola). Scientific interests – molecular-genetic researches of forest species, use of DNA methods in forest seed growing, selection of forest species. The author of 34 publications.

E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net

*GLADKOV Yuriy Fedorovich* – Postgraduate Student at the Chair of Forest Selection, Non-Woody Resources and Biotechnology, Volga State University of Technology (Russian Federation, Yoshkar-Ola). Scientific interests – molecular-genetic researches of trees. The author of 1 publication.

E-mail: glakov\_yuriy@yandex.ru

*A. A. Prokhorova, O. V. Sheykina, Yu. F. Gladkov*

#### GENETIC VARIATION OF VEGETATIVE OFFSPRINGS OF SPRUCE PLUS TREES ON THE BASE OF CLONES (REPUBLIC OF MARI EL)

**Key words:** *Hybridous Spruce (*Picea x fennica* (Regel) Kom.); plus trees; genetic variability; ISSR-markers.*

*Following the results of researches with the use of different types of molecular and genetic markers, genetic differentiation of Spruce population was established. The differentiation appeared because of environmental exposure. However, the level of genetic differentiation of plus trees of different geographic origin and the typical for them level of genetic variability are still unclear.*

*The article is devoted to the study of genetic variability and differentiation of clones of plus trees of Hybridous Spruce of different geographic origin.*

*Assessment of extent of genetic variation and differentiation was carried out on the base of study of ISSR parts of DNA with the use of polymerase chain reaction (PCR). Vegetative offsprings of plus trees from the Republic of Mari El, Udmurt republic, Kirov oblast, Perm oblast and Nizhny Novgorod oblast were studied in the course of the research.*

*The studied groups of plus trees have different level of genetic variation. Thus for example, the share of polymorphous locus varies from 55,4 to 91,1%, the observed number of alleles is 1,554 - 1,911, effective alleles are 1,272 1,484, genetic diversity no Nei is 0,168 - 0,286, Shannon index is 0,261 0,433. It was also found out that groups of plus trees are genetically differentiated and genetic distance no Nei between them is 0,0328 - 0,1195. With the help of cluster analysis the tested trees were divided into 3 groups in accordance with their origin: 1 – plus trees from the Republic of Mari El and Nizhny Novgorod oblast; 2 – plus trees from the Kirov and Perm oblasts; 3 – plus trees from the Udmurt Republic.*