

УДК 630*232.311.3

П. С. Новиков, О. В. Шейкина, Т. Н. Милютинa

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА АРХИВЕ КЛОНОВ ПО ISSR-МАРКЕРАМ

Приведены данные исследования генетической изменчивости по ISSR-маркерам плюсовых деревьев сосны обыкновенной на архиве клонов, позволивших выделить 144 полиморфных локуса. Основные параметры генетической изменчивости деревьев составили: индекс Шеннона – 0,407, генетическое разнообразие по Нею – 0,257, эффективное число аллелей – 1,405.

Ключевые слова: ISSR-маркеры, сосна обыкновенная, плюсовые деревья, генетическая изменчивость.

Введение. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*) широко распространена на территории нашей страны и играет важную роль в формировании структуры и функций лесных экосистем. Немаловажной задачей научных исследований является оценка степени использования генетического потенциала сосны при организации постоянной лесосеменной базы. Эта задача вытекает из самого содержания работ по организации лесного семеноводства в Российской Федерации. Для создания лесосеменных плантаций используются только плюсовые деревья. Как показывает практика, количество таких деревьев в различных субъектах РФ достаточно ограничено, поэтому есть определенный риск снижения генетического разнообразия искусственно создаваемых лесов при использовании в лесном семеноводстве ограниченного количества плюсовых деревьев. В связи с этим исследования, связанные с изучением индивидуальной изменчивости плюсовых деревьев и оценкой доли генетической изменчивости вида, приходящейся на плюсовые деревья, являются актуальными и необходимыми.

ДНК-маркеры доказали свою значимость в исследованиях генетического разнообразия. Часто в исследованиях применяются ПЦП-системы, основанные на RAPD, AFLP и SSR ДНК-маркерах [1, 2]. Основные недостатки этих методов – низкая воспроизводимость RAPD-анализа, высокая стоимость AFLP и необходимость знания фланговых последовательностей праймеров для SSR-анализа. ISSR-анализ не имеет большинства из этих ограничений [3–6]. Он широко используется научным сообществом в различных областях исследований растений [7]. При этом методе анализа амплифицируются участки между короткими тандемными микросателлитными повторами из 1–4 оснований ДНК, которые повсеместно присутствуют в геномах эукариот [8]. Они рассеяны по всему геному и различаются по числу повторяющихся единиц.

ISSR-анализ был успешно использован для оценки степени генетического разнообразия на меж- и внутривидовом уровне в широком диапазоне видов сельскохозяйственных культур, которые включают рис [9], пшеницу [10], просо [11], виноград [12], картофель [13] и подорожник [14]. Также он применялся при оценке генетического разнообразия какао [15], ели Дугласа и суджи [16] и даже грибов [17]. В то же время анализ литературы показал, что в России до сих пор исследования, посвященные изучению генетического разнообразия сосны обыкновенной по ISSR-маркерам, не проводились.

Цель работы заключалась в изучении генетической изменчивости плюсовых деревьев сосны обыкновенной на архиве клонов на основе проведения полимеразной цепной реакции с 7 ISSR-праймерами.

Достижение поставленной цели предусматривает решение следующих задач:

- 1) сбор образцов хвои для выполнения генетического анализа;
- 2) выделение ДНК и проверка его качества;
- 3) проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ISSR-праймерами;
- 4) выполнение электрофоретического разделения продуктов ПЦР;
- 5) обработка полученных гелей и расчет основных параметров, характеризующих уровень генетической изменчивости совокупности изучаемых плюсовых деревьев сосны обыкновенной.

Материалы и методы. Объектом исследований являлись клоны плюсовых деревьев сосны обыкновенной, растущие на архиве клонов в Учебно-опытном лесхозе Республики Марий Эл. Всего проанализировано 41 плюсовое дерево.

В качестве исходного материала для экстракции геномной ДНК использовали хвою, которую хранили после сбора при -20°C . За основу бралась стандартная методика с применением 2×СТАВ-буфера [18].

Для экспериментальной работы были взяты 7 ISSR-праймеров, характеризующихся высокой индивидуальной изменчивостью и обеспечивающих простоту интерпретации результатов анализа (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Характеристика используемых ISSR-праймеров

Праймер (Sequence 5'-3')	Оптимальная температура отжига (T_{m0} , $^{\circ}\text{C}$)	Количество циклов амплификации	Концентрация Taq- полимеразы, μl
(CA) ₆ AGG	60	45	0,2
(CA) ₆ GT	60		
(CA) ₆ AC	60		
(GA) ₈ T	65		
(AG) ₈ GCT	65		
(AG) ₈ GCA	60		
(AG) ₈ C	60		

Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 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. Для проведения реакции использовали набор реактивов «Encyclo PCR kit» (Evrogen). Режим амплификации: 5 мин денатурация при 94°C , 0,5 мин денатурация при 94°C , 45 сек отжиг ($45-60^{\circ}\text{C}$), элонгация 2 мин при 72°C , 7 мин достройка при 72°C , 45 циклов амплификации. Реакции проводили в тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл на амплификаторе MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD).

Электрофорез ДНК проводили в агарозных гелях с концентрацией агарозы 1,5 %. Разделение проводили в электрофорезной камере PowerPacTM Universal (BIO-RAD) в TBE буфере с добавлением бромистого этидия в течение 2–2,5 часов при напряжении электрического поля 70 mV.

Визуализацию ДНК, обработку и анализ полученных изображений проводили с помощью системы гель-документации GelDoc 2000 (BIO-RAD) с использованием программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. Математическую обработку данных проводили в среде POPGENE Version 1.32 [19]. ISSR-профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле, соответствующих определенным в табл. 2 фрагментам, и математически обрабатывались в среде POPGEN [19]. На основании полученных данных рассчитывались относительные частоты фрагментов. Полученные частоты ISSR-фрагментов использовались для оценки основных параметров генетической изменчивости плюсовых деревьев сосны. Для этого были рассчитаны следующие параметры оценки генетической

изменчивости: наблюдаемое число аллелей – N_a , эффективное число аллелей – N_e , общее генетическое разнообразие – H (индекс Нея) и индекс Шеннона – I .

Результаты и обсуждение. По результатам ISSR-анализа ДНК, выделенной из хвои клонов плюсовых деревьев сосны, было установлено, что 7 ISSR-праймеров позволяют определить 144 амплифицируемых фрагмента, из которых 29 фрагментов приходится на $(CA)_6AGG$, 13 – на $(CA)_6GT$, 20 – на $(CA)_6AC$, 21 – на $(GA)_8T$, 29 – на $(AG)_8GCT$, 19 – на $(AG)_8GCA$ и 13 – на $(AG)_8C$ (табл. 2.). Все обнаруженные локусы можно считать полиморфными, так как фрагмент ДНК, который бы встречался абсолютно у всех плюсовых деревьев независимо от происхождения, выявлен не был. Длина амплифицированных фрагментов ДНК у разных праймеров варьировала от 1900 до 130 пар нуклеотидов. Пример электрофореграммы продуктов ПЦР с праймером $(CA)_6AGG$ приведен на рис. 1.

Т а б л и ц а 2

Результаты ПЦР ДНК клонов плюсовых деревьев сосны

Праймер	Количество полиморфных фрагментов	Размеры амплифицируемых фрагментов, bp
$(CA)_6AGG$	29	1900, 1750, 1550, 1400, 1300, 1000, 850, 830, 800, 750, 700, 680, 650, 630, 570, 530, 500, 470, 450, 420, 400, 360, 320, 300, 270, 220, 180, 150, 130
$(CA)_6GT$	13	950, 830, 700, 560, 500, 430, 380, 370, 330, 280, 250, 230, 200
$(CA)_6AC$	20	1700, 1400, 1100, 950, 900, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 370, 350, 300, 290, 210, 200
$(GA)_8T$	21	1570, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 970, 900, 820, 770, 730, 670, 650, 620, 580, 530, 500, 480, 440, 400, 360
$(AG)_8GCT$	29	1800, 1700, 1500, 1300, 1200, 1100, 1000, 970, 800, 750, 730, 700, 680, 630, 590, 570, 550, 520, 500, 480, 430, 370, 350, 300, 270, 210, 180, 150, 130
$(AG)_8GCA$	19	1380, 1250, 1150, 950, 850, 780, 700, 670, 650, 630, 600, 560, 520, 470, 450, 430, 350, 330, 280
$(AG)_8C$	13	1100, 1000, 910, 750, 700, 650, 600, 500, 450, 400, 350, 250, 200

На основе анализа полученных электрофореграмм были рассчитаны частоты встречаемости аллелей обнаруженных локусов для анализируемой совокупности плюсовых деревьев. Полученные частоты ISSR-фрагментов использовались для оценки основных параметров генетической изменчивости плюсовых деревьев сосны. Расчеты показали, что в исследуемой группе плюсовых деревьев эффективное число аллелей (N_e) составило – 1,405, индекс Шеннона (I) – 0,407, общее генетическое разнообразие (H) – 0,257.

Для оценки уровня генетической изменчивости плюсовых деревьев по ISSR-маркерам необходим сравнительный анализ с показателями, присущими виду в данном географическом районе в целом. Однако, как уже отмечалось выше, в России исследования популяций сосны обыкновенной по ISSR-маркерам пока не проводились, и выполнить сравнительный анализ нет возможности. В то же время имеются работы по изучению сосны обыкновенной с использованием ISSR-маркеров за рубежом, в частности в Китае [20]. Как показывает анализ табл. 3, в целом уровень генетической изменчивости изученных плюсовых деревьев не уступает уровню генетической изменчивости на видовом уровне, выявленному в Китае: эффективное число аллелей 1,405 против 1,2652; генетическое разнообразие по Нею 0,257 против 0,2393 и индекс Шеннона 0,407 против 0,1581.

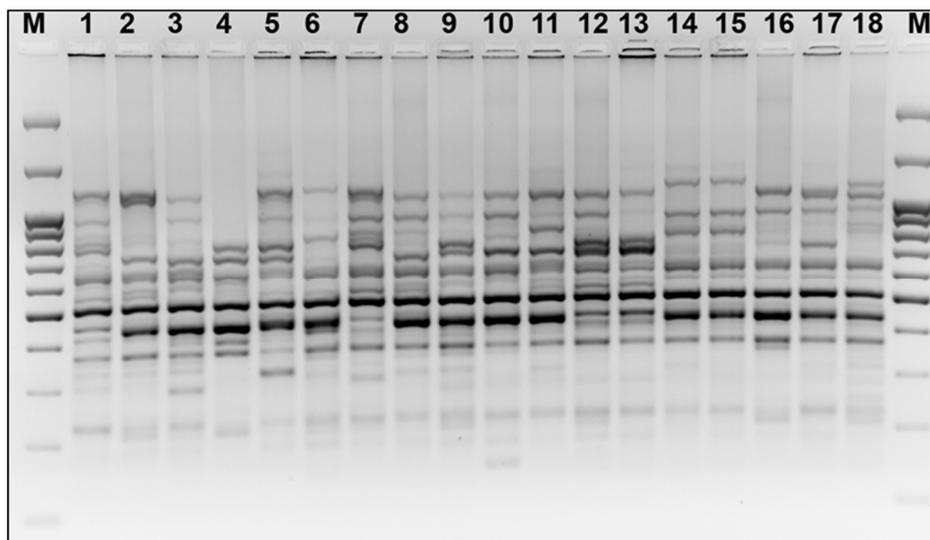


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК сосны с праймером $(CA)_6AGG$: 1-18 – номера образцов ДНК, М – маркер молекулярных размеров (СибЭнзим, 100bp+3,0kb)

Т а б л и ц а 3

Сравнительный анализ уровня генетической изменчивости сосны обыкновенной по ISSR-маркерам

Показатели генетической изменчивости	Плюсовые деревья сосны обыкновенной	Данные Li Hui-yu, Jing Jing, Liu Gui-frng и др. [20].	
		варьирование показателей в разных популяциях	в среднем по виду
Эффективное число аллелей (N_e)	1,405	1,1339-1,3349	1,2652
Генетическое разнообразие по Нею (H)	0,257	0,1340-0,3025	0,2393
Индекс Шеннона (I)	0,407	0,0857-0,2006	0,1581

Таким образом, проведенные исследования показали, что совокупность клонов плюсовых деревьев, представленных на архиве клонов в Республике Марий Эл, характеризуется достаточно высоким уровнем генетической изменчивости по ISSR-маркерам. Выполненная работа позволит внести определенный задел в исследования биоразнообразия сосны обыкновенной в Среднем Поволжье.

Выводы.

1. Исследования показали, что ISSR-анализ является хорошим инструментом для изучения и оценки уровня генетической изменчивости сосны обыкновенной, так как взятые для эксперимента ISSR-праймеры показали высокую индивидуальную изменчивость.

2. С использованием 7 ISSR-праймеров было выявлено 144 полиморфных фрагмента ДНК. Количество фрагментов у разных праймеров варьировало от 13 до 29 и в среднем на праймер составило 21. Длина амплифицированных фрагментов ДНК у разных праймеров варьировала от 1900 до 130 пар нуклеотидов.

3. Изученная группа плюсовых деревьев характеризуется следующими показателями генетической изменчивости: эффективное число аллелей (N_e) – 1,405, индекс Шеннона (I) – 0,407, общее генетическое разнообразие (H) – 0,257. Данные показатели позволяют говорить о достаточно высоком уровне генетической изменчивости плюсовых деревьев сосны обыкновенной, потомство которых представлено на архиве клонов в Республике Марий Эл.

Список литературы

1. Staub, J.E. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding / J.E. Staub, F.C. Serquen & M. Gupta // HortScience. – 1996. – Vol. 31(5). – P. 729–739.
2. Gupta, P.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat / P.K. Gupta, & R.K. Varshney // Euphytica. – 2000. – Vol. 113. – P. 163–185.
3. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski & D. Labuda // Genomics. – 1994. – Vol. 20. – P. 176–183.
4. Gupta, M. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats / M. Gupta, Y-S. Chyi, J. Romero-Severson & J.L. Owen // Theor Appl Genet. – 1994. – Vol. 89. – P. 998–1006.
5. Wu, K. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning / K. Wu, R. Jones, L. Danaeberger & P.A. Scolnik // Nucleic Acids Res. – 1994. – Vol. 22. – P. 3257–3258.
6. Meyer, W. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans* / W. Meyer, T.G. Mitchell, E.Z. Freedman & R. Vilgays // J Clin Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 2274–2280.
7. Godwin, I.D. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics / I.D. Godwin, E.A.B. Aitken & L.W. Smith // Electrophoresis. – 1997. – Vol. 18. – P. 1524–1528.
8. Tautz, D. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes / D. Tautz, & M. Renz // Nucleic Acids Res. – 1984. – Vol. 12. – P. 4127–4138.
9. Joshi, S.P. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* / S.P. Joshi, V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar & D.S. Brar // Theor Appl Genet. – 2000. – Vol. 100. – P. 1311–1320.
10. Nagaoka, T. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers / T. Nagaoka, & Y. Ogihara // Theor Appl Genet. – 1997. – Vol. 94. – P. 597–602.
11. Salimath, S.S. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers / S.S. Salimath, A.C. de Oliveira, I.D. Godwin & J.L. Bennetzen // Genome. – 1995. – Vol. 38. – P. 757–763.
12. Ajibade, S.R. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna* / S.R. Ajibade, N.F. Weeden & S.M. Chite // Euphytica. – 2000. – Vol. 111. – P. 47–55.
13. Huang, J. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA / J. Huang, & S.M. Sun // Theor Appl Genet. – 2000. – Vol. 100. – P. 1050–1060.
14. Wolff, K. PCR markers distinguish *Plantago* major subspecies / K. Wolff, & M. Morgan-Richards // Theor Appl Genet. – 1998. – Vol. 96. – P. 282–286.
15. Charters, Y.M. The use of self-pollinated progenies as ‘in-groups’ for the genetic characterization of cocoa germplasm / Y.M. Charters, & M.J. Wilkinson // Theor Appl Genet. – 2000. – Vol. 100. – P. 160–166.
16. Tsumura, Y. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) / Y. Tsumura, K. Ohba & S.H. Strauss // Theor Appl Genet. – 1996. – Vol. 92. – P. 40–45.
17. Hantula, J. Random amplified microsatellites (RAMS)- a novel method for characterizing genetic variation within fungi / J. Hantula, M. Dusabenyagasani & R.C. Hamelin // Eur J for Path. – 1996. – Vol. 26. – P. 159–166.
18. Rogers, S.O. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi / S.O. Rogers, A.J. Benedich // S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort (eds.) Plan Molecular Biology Manual. – Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1994. – P. D 1-8.
19. Yeh, F.C. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / F.C. Yeh, and T.J.B. Boyle // Belgian Journal of Botany. – 1997. – Vol. 129. – P. 157.
20. Hui-yu, Li. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers / Li Hui-yu, Jing Jing, Liu Gui-frng, Ma Xu-jun, Dong Jing-xiang, Lin Shi-jie// Journal of Forest Research.– 2005.– Vol. 16(3).– P. 216-218.

Статья поступила в редакцию 05.09.11.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7050 от 29 июля 2011 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «МарГТУ».

P. S. Novikov, O. V. Sheikina, T. N. Milutina

**VARIATION OF PINUS SYLVESTRIS PLUS TREES ON THE CLONE ARCHIVE
IN ACCORDANCE WITH ISSR MARKERS**

Genetic variation researches data of plus trees of pinus sylvestris on the clone archive in accordance with ISSR-markers are given. The data allowed to sort out 144 polymorphic locus. Basic parameters of the trees genetic variation were: Shannon index – 0,407, Nei's genetic diversity – 0,257 and effective number of alleles – 1,405.

Key words: *ISSR markers, Pinus Sylvestris, plus trees, genetic variation*

НОВИКОВ Петр Сергеевич – аспирант кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии МарГТУ. Область научных интересов – лесное семеноводство, молекулярная генетика древесных видов. Автор 19 публикаций.

E-mail: novikov-petr@mail.ru

ШЕЙКИНА Ольга Викторовна – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии МарГТУ. Область научных интересов – лесное семеноводство, молекулярная генетика древесных видов. Автор 30 публикаций.

E-mail: ShejkinaOV@marstu.net

МИЛЮТИНА Татьяна Николаевна – аспирант кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии МарГТУ. Область научных интересов – лесное семеноводство, молекулярная генетика древесных видов. Автор 18 публикаций.

E-mail: Milutina_Tanja@mail.ru