

УДК 575.2:575.22:574.3
AGRIS F30

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/42/03>

ОТБОР ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. НА ВОСТОЧНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ РАВНИНЕ

©Пришнивская Я. В., ORCID: 0000-0003-1513-2682, Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Россия, yana_prishnivskaya@mail.ru

©Нассонова Е. С., ORCID: 0000-0002-7589-4913, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, lena.nassonova@mail.ru

©Васильева Ю. С., ORCID: 0000-0002-2255-2434, канд. биол. наук,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Россия, Yulianechaeva@mail.ru

©Боронникова С. В., ORCID: 0000-0002-5498-8160, д-р биол. наук,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Россия, SVBoronnikova@yandex.ru

SELECTING OF POLYMORPHIC LOCI OF GENOME FOR IDENTIFICATION OF POPULATIONS OF *PINUS SYLVESTRIS* L. ON EAST-EUROPE PLAIN

©Prishnivskaya Ya., ORCID: 0000-0003-1513-2682, Perm State University,
Perm, Russia, yana_prishnivskaya@mail.ru

©Nassonova E., ORCID: 0000-0002-7589-4913, Perm State University,
Perm, Russia, lena.nassonova@mail.ru

©Vasileva Yu., ORCID: 0000-0002-2255-2434, Ph.D., Perm State University,
Perm, Russia, Yulianechaeva@mail.ru

©Boronnikova S., ORCID: 0000-0002-5498-8160, Dr. habil.,
Perm State University, Perm, Russia, SVBoronnikova@yandex.ru

Аннотация: у 8 смежных популяций *Pinus sylvestris* L., расположенных на Восточно-Европейской равнине, были протестированы десять пар праймеров к 10 генам, а также четырех пары праймеров к 4 локусам не кодирующих регионов хпДНК. Из протестированных 14 пар праймеров к исследуемым локусам были отобраны два локуса не кодирующих регионов хпДНК (*psbA-trnH*, *trnL-trnF*), которые наиболее полиморфны, имеют гомологичные последовательности в базах данных и поэтому они рекомендованы для молекулярно-генетической идентификации смежных популяций *P. sylvestris* на Восточно-Европейской равнине.

Abstract. 10 pairs of primers from 8 related *Pinus sylvestris* L. populations collected on East-European plain to 10 genes and 4 primer's pairs to 4 loci of uncoding cDNA regions. 2 loci of uncoding cDNA regions (*psbA-trnH*, *trnL-trnF*) were selected from tested 14 primer's pairs. These two loci are most polymorphic and has homologous consistencies in data bases. Therefore, these loci is recommended for molecular-genetic identification of related *Pinus sylvestris* L. populations on East-European plain.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, полиморфные локусы, молекулярные маркеры, идентификация, популяция, *Pinus sylvestris* L., Восточно-Европейская равнина.

Keywords: genetic diversity, polymorphic loci, molecular markers, identification, population, *Pinus sylvestris* L., East-European plain.

Сохранение генетических ресурсов ценных древесных растений предполагает исследование сложившейся нативной популяционной структуры, то есть характерных для вида уровней внутривидовой популяционной генетической изменчивости и пространственного распределения генетической изменчивости [1, 2]. Известно, что за счёт сокращения эффективной численности древесных растений в популяциях вследствие проведения сплошнолесосечных рубок, гибели насаждений в результате пожаров, болезней, ветровала, загрязнения окружающей среды наблюдается неуклонное снижение генетического разнообразия [3]. Вырубка леса, в особенности несанкционированная, ликвидируя часть генотипов, неминуемо ведет к генетическому обеднению популяций и уменьшению генетического разнообразия [4]

Материалы и методы исследований

Объектом исследования являются 8 хорологически смежных популяций сосны обыкновенной, расположенные на востоке Восточно-Европейской равнины. Первая популяция находится на левобережье р. Ветлуги, вторая — в бассейне р. Юг и р. Северной Двины, третья — в верховьях р. Ветлуги, четвертая — в бассейне среднего течения р. Ветлуги, пятая — в бассейне нижнего течения р. Ветлуги и на левобережье р. Волги на участке от устья р. Ветлуги до г. Новочебоксарска, шестая — в междуречье р. Суры и р. Волги, седьмая — в бассейне р. Моломы, восьмая — на северной оконечности Вятских Увалов.

Выделение ДНК проводили по методике С. Роджерса с соавторами [5], с небольшими модификациями [6]. Концентрацию и качество ДНК определяли на приборе Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 (“Thermo scientific”, USA).

Для проведения ПЦР концентрацию ДНК каждой пробы выравнивали до 10 нг/мкл. Для отбора полиморфных локусов генома *P. sylvestris* в каждой из восьми популяций отобраны по 12 деревьев, у которых в пробах ДНК выявлены наивысшие показатели генетического разнообразия на основании полиморфизма ISSR-PCR маркеров.

Для амплификации изучаемых локусов использовали реакционную смесь объемом 20 мкл следующего состава: 10x буфер для ПЦР («Силекс М», Россия); 1,5 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждого dNTP; 1 мкМ каждого праймера; 0,5 ед. Tag-полимеразы; 10 нг ДНК. Далее продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле. Ферментативную очистку продуктов ПЦР проводили смесью ферментов ExoI и FAST-AP (“Fermentas”, Литва) в отношении 0,5:1 из расчета 1,5 мкл ферментативной смеси на 5 мкл продуктов ПЦР.

Реакцию ферментативной очистки проводили в амплификаторе GeneAmp PCRSystem 9700 (“Applied Biosystems”, США) по программе: 37°C — 30 мин, 80°C — 15 мин, охлаждение до 4°C.

Для реакции секвенирования применяли набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США), в качестве праймера использованы сначала прямая, а затем обратная последовательности из пары праймеров, с которой была поставлена ПЦР. Амплификацию проводили в термоциклере GeneAmp PCRSystem 9700 (“Applied Biosystems”, США) по программе: 5 мин — 94°C, следующие 30 циклов (94°C — 30 сек, Тотж°C — 45 сек, 72°C — 2 мин), 72°C — 10 мин. Очистку продуктов реакции

секвенирования от невступивших в реакцию меченых нуклеотидов осуществляли с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (“Applied Biosystems”, США).

В исследовании использовался метод автоматического ферментативного секвенирования. Капиллярный электрофорез синтезированных последовательностей проведен в двух направлениях в ПЦР-лаборатории кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ (Россия) на 24-капиллярном генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500xL (“Applied Biosystems”, США).

Результаты исследований

Были протестированы десять пар праймеров к 10 генам, а также четыре пары праймеров к 4 локусам некодирующих регионов хпДНК. Для амплификации локусов избранных генов были использованы праймеры, приведенные в литературных источниках (Таблица).

Таблица 1

ИЗУЧЕННЫЕ ЛОКУСЫ ГЕНОМА *P. sylvestris*

№	Локус	Последовательности праймеров (прямой /обратный)	Продукт, размер гена или региона	Источник
1	<i>dhn1</i>	TACCCCTGAGGAAGCTGAGGAAAAG/ AGGAAGAAGTTGCCAATTCAG	Дегидрин1, часть гена: 1263 п.н.	Wachowiak et al., 2009
2	<i>dhn3</i>	TACTCGTTATTAAGATGGCGCAACC/ CGATTGTACCCGAAGTCCCATTAT	Дегидрин3, часть гена: 359 п.н.	Wachowiak et al., 2009
3	<i>dhn4</i>	AGAAGGAAGATGAGGGAAGGCAATG/ CACATATTAGATGGGCAGGGGTCT	Дегидрин4, часть гена: 231 п.н.	Wachowiak et al., 2009
4	<i>dhn5</i>	GTATGTTTCGGCTTATTGGGCAAAA/ AACCGCAAATACCGACCTCACCATC	Дегидрин5, часть гена: 547 п.н.	Wachowiak et al., 2009
5	<i>dhn7</i>	ATTAAGATGGCGGAAGAGCAACAGG/ TTGTACCCGAAGTCCCATT	Дегидрин7, часть гена: 364 п.н.	Wachowiak et al., 2009
6	<i>4CL</i>	TCTGGCTCCTGCGGAACAGT/ AGGAACGACTGCTGCGTCAG	4-кумарат:СоА лигаза, часть гена: 477 п.н.	Ersoz et al., 2010
7	<i>C3H</i>	GTTCTGCAGGGGAATGTCTGTTC/ ACCAGTGGGAAGCCAATGGA	Кумарат 3- гидроксилаза, часть гена: 552 п.н.	Ersoz et al., 2010
8	<i>caf1</i>	AACTCTGCCAAAGTCACAAGAAAAC A/GGACAATAGAGACTTAAATGGAATC CAACA	Фактор сборки хроматина I, часть гена: 579 п.н.	Ersoz et al., 2010
9	<i>cesa3</i>	GACGAAAGAGCATTGTTGATGAGC/ AGTGAGCAAACCTGACGGCTGG	Целлюлозосинтаза 3, часть гена: 630 п.н.	Ersoz et al., 2010
10	<i>comt4</i>	CTAGGTTGCGCTTGGACCGT/ TTTGTGTGGCGATTTGGCAA	Катехол О- метилтрансфераза, часть гена: 444 п.н.	Ersoz et al., 2010
11	<i>trnV</i>	GTAGAGCACCTCGTTTACAC/ CTCGAACCGTAGACCTTCTC	Некодирующий регион хпДНК, 548 п.н.	Wang et al., 1999
12	<i>rpl20-rps18</i>	CTTCGTCGTTTGTGGATTAC/ AGTCGATTTATTAGTGAGCA	Некодирующий регион хпДНК, 567 п.н.	Wang et al., 1999
13	<i>psbA-trnH</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC/ CGCGCATGGTGGATTACAAATCC	Некодирующий регион хпДНК, 665 п.н.	Ferri et al., 2009
14	<i>trnL-trnF</i>	GGTCAAGTCCCTCTATCCC/ ATTTGAACTGGTGACACGAG	Некодирующий регион хпДНК, 462 п.н.	Ferri et al., 2009

Праймеры были амплифицированы с тотальной ДНК *P. sylvestris* для выявления их эффективности в геноме данного вида. Для проведения амплификации и отбора наиболее эффективных праймеров к выбранным генам *P. sylvestris* амплификация проводилась по стандартной схеме ПЦР.

В результате тестовой амплификации девять пар праймеров для локусов *dhn3*, *dhn4*, *dhn7*, *C3H*, *caf1*, *trnV*, *rpl20-rps18*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF* дали положительную амплификацию и фрагменты ДНК нужного размера, однако, на геле так же присутствовали и другие ампликоны, что свидетельствовало о наличии неспецифической амплификации. Остальные локусы не амплифицировались, либо не выявляли ампликонов нужного размера и были исключены из дальнейшего исследования. Основной причиной отсутствия или неспецифической амплификации может быть неполное сродство праймеров с ДНК исследуемого вида. Кроме того, спровоцировать синтез неспецифических фрагментов может излишняя, или недостаточная концентрация праймера, неоптимальная температура его отжига, концентрация ионов магния или количество ДНК-матрицы. Поэтому, для получения качественных целевых ампликонов мы провели оптимизацию условий ПЦР, для чего варьировали пропорции и концентрации данных компонентов в ПЦР-смеси и температуру отжига в нескольких повторных ПЦР для каждого из 10 тестируемых локусов. В результате были получены более качественные ПЦР-продукты исследуемых локусов.

Итак, были получены продукты амплификации пяти локусов сосны обыкновенной, которые использовались для проведения тестового секвенирования последовательностей данных генов. В результате секвенирования полученных продуктов амплификации пяти локусов *P. sylvestris*, обработки и сравнения секвенированных последовательностей с имеющимися в базах данных установлено, что лишь три (*dhn3*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*) из пяти секвенированных локусов имеют гомологичные последовательности в базах данных и могут быть идентифицированы в геноме *P. sylvestris*. Остальные локусы были исключены из дальнейшего анализа. Так же был исключен ген *dhn3*, так как он оказался более консервативным и не подходил для использования в идентификации смежных популяций *P. sylvestris*.

Таким образом, для изучения нуклеотидного полиморфизма и идентификации популяций *P. sylvestris* были отобраны два локуса некодирующих регионов хпДНК и проведено секвенирование их последовательностей для проведения идентификации смежных популяций *P. sylvestris* на Восточно-Европейской равнине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (задание 5.6881.2017/8.9)

Список литературы:

1. Алтухов Ю. П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС. 2004. Т.8. № 2. С. 40-59.
2. Макеева В. М., Смуров А. В., Политов Д. В. и др. Оценка состояния генофонда и жизнеспособности лесопосадок ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из парков города Москвы и Подмоскovie // Леса России: политика, промышленность, наука, образование: Материалы третьей международной научно-технической конференции. 2018. С. 187-190.
3. Видякин А. И. Популяционная структура сосны обыкновенной на востоке европейской части России: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург. 2004. 48 с.

4. Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Кузнецова Т. Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2013. 312 с.
5. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biology*. 1985. Vol. 1. № 19. P. 69-76.
6. Бельтюкова Н. Н., Нечаева Ю. С., Пришнивская Я. В., Тайман К. Е. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края // *Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование: материалы международной конференции*. Пермь, 2011. С. 278-282.
7. Wachowiak W., Balk P. A., Savolainen O. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // *Tree Genetics & Genomes*. 2009. № 5. P. 117-132.
8. Ersoz E. S., Wright M. H., Gonza S. C., 'lez-Marti'nez et al. Evolution of disease response genes in loblolly pine: insights from candidate genes // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. № 12. P. 1-12.
9. Wang X.-R., Tsumura Y., Yoshimaru H. et al./Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, *Pinaceae*) based on chloroplast *rbcl*, *matk*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnv* intron sequences // *American Journal of Botany*. 1999. V.86. № 12. P. 1742-1753.
10. Ferri G., Alù M., Corradini B. et al. Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach // *Int J Legal Med*. 2009. V. 23. P. 395-401.

References:

1. Altuhov, Yu. P. (2004). Dinamika genofondov pri antropogennyh vozdeystviyah. *Vestnik VOGiS*, 8(2). 40-59. (in Russian).
2. Makeeva, V. M., Smurov A. V., & Politov D. V. et al. (2018). Ocenka sostoyaniya genofonda i zhiznesposobnosti lesoposadok eli evropejskoj (*Picea abies* (L.) Karst.) iz parkov goroda Moskvy i Podmoskov'ya. In *Lesa Rossii: politika, promyshlennost', nauka, obrazovanie, materialy tret'ej mezhdunarodnoj nauchno-tekhnicheskoy konferencii*, 187-190. (in Russian).
3. Vidyakin, A. I. (2004). Populyacionnaya struktura sosny obyknovennoj na vostoке evropejskoj chasti Rossii: *avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. Ekaterinburg*, 48. (in Russian).
4. Vetchinnikova, L. V., Titov, A. F., & Kuznecova, T. Yu. (2013). Karel'skaya bereza: biologicheskie osobennosti, dinamika resursov i vosproizvodstvo. *Petrozavodsk. Karel'skij nauchnyj centr RAN*, 312. (in Russian).
5. Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 1(19). 69-76.
6. Beltukova, N. N., Nechaeva, Yu. S., Prischivskaya, Ya. V., & Tayman, K. E. (2011). Optimization of methods for DNA extraction of some coniferous species plant of Perm Krai. In *Sintez znaniy v estestvennyh naukah. Rudnik budushchego: proekty, tekhnologii, oborudovanie Materialy mezhdunarodnoj konferencii, Perm'*, 278-282.
7. Wachowiak, W., Balk, P. A., & Savolainen, O. 2009. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics & Genomes*, (5). 117-132.
8. Ersoz, E. S., M. H. Wright, S. C. Gonza, 'lez-Marti'nez et al. (2010). Evolution of disease response genes in loblolly pine: insights from candidate genes. *PLoS ONE*, 5(12). 1-12.
9. Wang, X.-R., Tsumura, Y., & Yoshimaru, H. et al. (1999). Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, *Pinaceae*) based on chloroplast *rbcl*, *matk*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnv* intron sequences. *American Journal of Botany*, 86(12). 1742-1753.

10. Ferri, G., Alù, M., & Corradini, B. et al. (2009). Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach. *Int J Legal Med*, (23). 395–401.

Работа поступила
в редакцию 15.04.2019 г.

Принята к публикации
19.04.2019 г.

Ссылка для цитирования:

Пришневская Я. В., Нассонова Е. С., Васильева Ю. С., Боронникова С. В. Отбор полиморфных локусов генома для идентификации популяций *Pinus sylvestris* L. на Восточно-Европейской равнине // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5. №5. С. 25-30. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/42/03>.

Cite as (APA):

Prishnivskaya, Ya., Nasonova, E., Vasileva, Yu., & Boronnikova, S. (2019). Selecting of Polymorphic Loci of Genome for Identification of Populations of *Pinus sylvestris* L. on East-Europe Plain. *Bulletin of Science and Practice*, 5(5), 25-30. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/42/03>. (in Russian).