

УДК 577.21:582.475.2
AGRIS F30

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/11>

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕНОФОНДА ЗАПАДНОЙ РАСЫ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) УРАЛА НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

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

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

©**Чертов Н. В.**, ORCID: 0000-0003-0250-220X, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, super.gall@mail.ru

©**Жуланов А. А.**, ORCID: 0000-0003-2546-9350, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, aumakua.ru@gmail.com

ESTIMATION OF THE GENE POOL STATE OF THE WESTERN RACE OF SIBERIAN LARCH (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) IN URALS ON THE BASIS OF MICROSATELITE MARKERS POLYMORPHISM

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

©**Sboeva Ya.**, ORCID: 0000-0003-1513-2682, Perm State National Research University, Perm, Russia, yana_prishnivskaya@mail.ru

©**Chertov N.**, ORCID: 0000-0003-0250-220X, Perm State National Research University, Perm, Russia, super.gall@mail.ru

©**Zhulanov A.**, ORCID: 0000-0003-2546-9350, Perm State National Research University, Perm, Russia, aumakua.ru@gmail.com

Аннотация. На основании анализа полиморфизма двух типов микросателлитных маркеров (ISSR и SSR) проведена оценка состояния генофондов пятнадцати выборок западной расы лиственницы сибирской *L. sibirica* из трех районов Урала: Северного, Среднего и Южного. Выявлены параметры генетического разнообразия, установлена его структура на внутривидовом уровне. Для оценки уникальности генофонда использовали коэффициент генетической оригинальности (КГО), анализ которого позволил выявить популяции с типичными и специфичными для региона исследований генофондами. Установлено, что изученные выборки в целом характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия. Обнаружено, что наибольшей спецификой характеризуются генофонды выборок с Южного Урала, наименьшие значения КГО, то есть более типичные генофонды, отмечены в североуральских выборках *L. sibirica*, средними значениями КГО обладают выборки Среднего Урала. Также были обнаружены 3 уникальные аллели в выборках *ZIL*, *BND* и *KCH*, в остальных — уникальных маркеров не выявлено. Для комплексной оценки состояния генофондов популяций все установленные показатели генетического разнообразия переведены в разработанную на примере изученных популяций *L. sibirica* шкалу оценки состояния генофондов. На основании данных о генетическом разнообразии, полученных с помощью двух типов молекулярных маркеров, установлено, что в удовлетворительном состоянии находятся генофонды десяти изученных популяций *L. sibirica*, а в пяти отмечены признаки обеднения генофонда. По итогам проведенного исследования даны рекомендации по сохранению генетических ресурсов *L. sibirica* на Урале.

Abstract. Based on the analysis of the polymorphism of two types of microsatellite markers (ISSR and SSR), the state of gene pools of the fifteen of Siberian larch populations from three regions of the Urals: Northern, Middle and Southern was estimated. The parameters of genetic diversity were revealed, its structure was established at the intrapopulation level. To assess the uniqueness of the gene pool, we used the coefficient of genetic originality (KGO), the analysis of which revealed populations with typical and region-specific gene pools. It was established that the studied samples are generally characterized by a high level of genetic diversity. It was found that the gene pools of samples from the South Urals are characterized by the greatest specificity, the lowest values of KGO, i. e. more typical gene pools, are noted in the North Urals samples of *L. sibirica*, the average values of KGO are from the samples of the Middle Urals. Also, 3 unique alleles were found in the ZIL, BND, and KCH samples, in the rest, no unique markers were detected. For a comprehensive assessment of the state of the gene pools of populations, all established indicators of genetic diversity have been transferred to the scale for assessing the status of gene pools developed on the example of the studied *L. sibirica* populations. Based on data on genetic diversity obtained using two types of molecular markers, it was found that the gene pools of ten studied *L. sibirica* populations are in satisfactory condition, and five have signs of gene pool degradation. Based on the results of the study, recommendations are made on the conservation of *L. sibirica* genetic resources in the Urals.

Ключевые слова: полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, микросателлитные маркеры, ISSR, SSR, генофонд, *Larix sibirica*, Урал.

Keywords: DNA polymorphism, genetic diversity, microsatellite markers, ISSR, SSR, gene pool, *Larix sibirica*, Urals.

Введение

Интенсивная эксплуатация человеком лесных ресурсов приводит к сокращению площади лесов во всем мире [1]. Оценка современного состояния генетических ресурсов лесных фитоценозов играет важную роль в формировании как фундаментальных основ изучения и сохранения растительных ресурсов, так и прикладных аспектов их рационального использования в хозяйственно-экономических интересах. Поэтому мониторинг состояния лесных генетических ресурсов, и оценка генетического разнообразия лесных насаждений с использованием методов анализа ДНК является одним из основных направлений развития биотехнологий [2]. На основе оценки характера изменчивости и популяционной структуры можно наметить общие пути сохранения генофонда вида в регионе на популяционной основе, отобрать локальные популяций для сохранения и воспроизводства вида [3]. Одними из инструментов изучения генетических процессов являются молекулярно-генетические маркеры [4]. Изучение генофондов ресурсных видов растений с использованием молекулярных маркеров ДНК основано на анализе количественных характеристик генетического разнообразия популяций [5], для выявления которого в гетерогенных природных популяций растений необходим анализ с использованием, как минимум, двух типов высоко полиморфных молекулярных маркеров [6]. Межмикросателлитные или ISSR-маркеры являются высокополиморфными и дают возможность одновременно исследовать десятки локусов в геноме изучаемого вида, за счет чего обладают огромной информативностью [7]. В свою очередь ядерные микросателлиты (SSR-маркеры) благодаря кодоминантному типу наследования снимают ограничения, накладываемые доминантностью

ISSR-маркеров, и позволяют достоверно оценить параметры гетерозиготности и популяционной структуры вида. В совокупности эти два типа молекулярных маркеров позволяют проанализировать большую часть генома изучаемого вида, дать разностороннюю характеристику изучаемых генофондов и выявить их специфические особенности.

Основное внимание необходимо направить на изучение генофондов лесных ресурсных видов растений, занимающих обширные ареалы и имеющих хозяйственное значение. Одними из ценных и широко распространенных хвойных видов растений России являются виды рода *Larix* Mill, которые играют большую водоохранную и почвозащитную роль, особенно в северных и горных лесах. На Урале род *Larix* представлен западной расой лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb. [8], которую Н. В. Дылис [9] выделил как лиственницу Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.).

Несмотря на обширные исследования популяций *L. sibirica* Урала на протяжении долгого времени [10–11], все же полученных данных недостаточно для комплексной оценки генетических ресурсов и состояния генофонда вида в данном регионе. В связи с этим изучение генофондов популяций *L. sibirica* Урала на основе анализа полиморфизма двух типов ДНК-маркеров, и разработка методики оценки состояния генофондов этого вида являются актуальной задачей для сохранения популяций продуктивных и устойчивых к действию различных факторов среды.

Таким образом, *цель данного исследования* — провести оценку состояния генофондов популяций западной расы лиственницы сибирской на Урале на основании анализа полиморфизма двух типов молекулярных маркеров.

Материал и методика

Объектами исследований являлись пятнадцать выборок *L. sibirica* Урала. Пять располагаются на Южном Урале: *KAR, IRM, VSN* — из Челябинской области и *KUL, ZIL* — из респ. Башкортостан. Пять выборок Среднего Урала: *KCH, BIL* — из Свердловской области и *POL, OSA, SKS* — из Пермского края. Также на Северном Урале исследованы пять выборок лиственницы сибирской: *TUL, ISH, KR, V, BND, GN* (Пермский край). Выборки производились из разных по условиям произрастания насаждений лиственницы (горные и равнинные области района исследований). Таким образом, избранные для изучения популяции располагаются в большом широтно–высотном градиенте: протяженность региона исследований составляет более 1000 км с севера на юг, а высотность изменяется от 150 до 900 метров над уровнем моря (Таблица 1). Для молекулярно-генетического анализа в каждой популяции была собрана хвоя с 28–32 деревьев примерно одного возраста, расстояние между деревьями составляло не менее 80 м.

Для выделения ДНК использовали СТАВ-метод [12], модифицированный добавлением в качестве сорбента PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). Навеска растительного материала составляла 20 мг. Концентрацию и спектральную характеристику ДНК определяли на приборе SpectrofotometrTMNanoDrop2000 (Thermo scientific, США). Для проведения ПЦР концентрацию ДНК каждой пробы выравнивали до 10 нг/мкл.

Исследование генетического разнообразия *L. sibirica* Урала проведено на основе анализа полиморфизма ДНК с помощью двух типов микросателлитных маркеров с разным типом наследования — полилокусных доминантных ISSR-маркеров (Inter Simple Sequence Repeats [13]) и монолокусных кодоминантных ядерных SSR-маркеров (Simple Sequence Repeats [14–15]), основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ISSR-ПЦР анализ проводили с использованием последовательностей 5 ISSR-праймеров, наиболее эффективных в геноме данного вида по результатам предыдущих исследований [16] по стандартной методике [17].

Таблица 1.

ИЗУЧЕННЫЕ ВЫБОРКИ *L. sibirica*

Обозначение популяции	Географическая привязка	Субъект РФ	Количество проб, шт
KAR	Карабашский район, в 25 км на северо-запад от г. Карабаш,	Челябинская область	32
IRM	Гора Большой Иремель, 12 км на северо-запад от с. Тюлюк	Челябинская область	28
VSN	Пластовский район, в 26 км к юго-западу от г. Пласт, с. Верхняя Санарка	Челябинская область	30
KUL	Абзелиловский район, в 8 км к юго-западу от с. Аскарново, д. Кулукасово	Республика Башкортостан	30
ZIL	Зилаирский район, в 15 км к юго-западу от с. Зилаир	Республика Башкортостан	30
KCH	Юго-восточный склон горы Качканар, 34 км юго-восток от г. Качканар	Свердловская область	30
BIL	Городской округ Первоуральск, 1,5 км восточнее пгт. Билимбай	Свердловская область	30
POL	Добрянский район, ООПТ «Полазненский бор», 500 м на северо-восток от д. Заборье	Пермский край	28
OSA	Осинский район, 4,5 км на северо-запад от д. Монастырка	Пермский край	30
SKS	Суксунский район, ООПТ «Лиственничная роща», 1 км от д. Бор	Пермский край	30
TUL	Заповедник «Вишерский», западный склон хребта Тулымский камень	Пермский край	30
ISH	Заповедник «Вишерский», юго-западный склон горы Ишерим	Пермский край	30
KRV	Красновишерский район, 10 км на юго-восток от г. Красновишерск	Пермский край	30
BND	Чердынский район, 5 км на север от д. Бондюг	Пермский край	30
GN	Верховья р. Кама, 50 км на северо-запад от поселка Гайны	Пермский край	30

Для SSR-анализа использовали модификацию метода с использованием универсального флуоресцентно-меченного праймера M13 [18]. Была использована мультиплекс-ПЦР для одновременного анализа нескольких микросателлитных локусов [19]. Для анализа использовали праймеры для восьми SSR-локусов (Таблица 2), из литературных источников [20].

Реакционная смесь содержала: 1 единица ДНК-полимеразы; 2 мкл стандартного 10× буфера для ПЦР; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; по 8 пмоль флуоресцентно меченного праймера M13 и обратного праймера; 2 пмоль прямого праймера; 5 мкл раствора ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 10 мин. 94 °C; 30 циклов 94 °C 30 с., градиент 52–58 °C 45 с., 72 °C 45 с.; 8 циклов 94 °C 30 с., градиент 53 °C 45 с., 72 °C 45 с.; 10 мин 72 °C. Для детекции продуктов ПЦР использован электрофорез в 2% агарозном геле в 1×TBE буфере, с окрашиванием бромистым этидием и фотографированием в проходящем УФ-свете, а также капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500×L (Applied Biosystems, США) для визуализации и анализа результатов ПЦР. Компьютерный анализ полученных данных произведен с помощью программного обеспечения GgenomeLab GenXP.

Таблица 2.

ХАРАКТЕРИСТИКА M13-МОДИФИЦИРОВАННЫХ SSR-ПРАЙМЕРОВ

Локус	Последовательность, F + R (5' → 3')	T _{отж} , °C	L _{фр} , п.н.
bcLK189	M13-accatacgcataccsaataga + agtttctttccacacaaat	58	155–170
Ld101	M13-acaccaggactctctgactac + ggtgattccagaagcaggtg	58	189–225
bcLK228	M13-ccctaaccctagaatccaataa + gaggaaggcgacaagtcatt	61	179–215
Ld56	M13-agccatcgtggttcttcttg + ctgttaactgtgacaccacc	58	227–243
Ld50	M13-gaaggcgactttacatgccc + tccatctttatgtctcttccatgc	58	161–189
bcLK253	M13-aacaccatagtgaatgtgc + tcctctgttgatgccactt	58	199–204
Ld42	M13-tcgtatgcattgtccaatttcc + tccaagtgaggtcacacgag	58	167–186
bcLK263	M13-cgattggtatagtggtcattgt + ccatcataccttcttgaagag	58	191–254

Примечание: M13 — последовательность: tgtaaacgacggccagt; F и R — прямой и обратный праймеры соответственно; T_{отж} — температура отжига праймера; L_{фр} — длина амплифицируемого фрагментов с учетом добавления M13.

Компьютерный анализ полиморфизма ДНК проводили с помощью компьютерных программ POPGENE 1.31 и специализированного макроса GenAIE×6 для MSExcel с определением доли полиморфных локусов (P_{95}), наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность (H_o и H_e соответственно), информационного Индекса Шеннона (I) [21]. Для выявления структуры внутривидового разнообразия применяли показатели внутривидового разнообразия (μ) и доли редких морф (h) [22]. Оценка состояния генофондов популяций проведена в соответствии с методикой С. В. Боронниковой [23]. За основу взята шкала оценки, разработанная С. В. Боронниковой для *P. tremula* [6] и модифицированная авторами исследования для лиственницы [24]. Выявление специфических особенностей генофондов было проведено по модифицированной для дикорастущих древесных видов растений методике подсчета коэффициента генетической оригинальности — КГО [25].

Результаты и их обсуждение

Проанализирован полиморфизм ДНК у 448 деревьев из пятнадцати изученных выборок *L. sibirica*. Всего было выявлено 138 ISSR-маркеров, из которых 136 являлись полиморфными ($P_{95}=0,985$). Число амплифицированных ISSR-маркеров варьировало в зависимости от праймера от 21 (CR-215) до 37 (X11), а их размеры — от 170 пн до 1680 пн. Доля полиморфных локусов оказалась наибольшей в выборке ZIL произрастающей на плато Зилаир республики Башкортостан ($P_{95} = 0,943$), а наименьшей — в выборке POL ($P_{95} = 0,747$) из Пермского края, разница между данными показателями достоверна ($4,28 > 1,96$). Ожидаемая гетерозиготность (H_e) на общую выборку *L. sibirica* составила 0,185. Данный показатель наибольший в выборке BIL ($H_e = 0,219$), а минимальный — в выборках TUL и POL ($H_e = 0,153$), разница между наибольшим и наименьшими значениями этого показателя оказалась не достоверна. Таким образом, основные параметры генетического разнообразия, установленные с использованием ISSR-маркеров, в изученных выборках имеют высокие значения. Самыми разнообразными выборками оказались выборки ZIL и BIL, а наименее разнообразными POL и TUL (Таблица 3).

Все восемь исследованных SSR-локусов оказались полиморфными. Общее число аллелей на локус в 15 выборках варьировало от 4 (локус bcLK253) до 37 (локус bcLK263). Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность на общую выборку *L. sibirica* составили $H_o = 0,461$ и $H_e = 0,623$. Данные показатели максимальны в выборках IRM ($H_o = 0,567$) и GN ($H_e =$

0,682), а в выборках *ISH* ($H_o = 0,366$) и *SKS* ($H_e = 0,520$) данные показатели оказались наименьшими (Таблица 3).

Таблица 3.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕНОФОНДОВ ИЗУЧЕННЫХ ВЫБОРОК *L. sibirica*

Выборка	I. Основные показатели генетического разнообразия		II. Внутривыборочное разнообразие		III. Генетическая структура		VI. Специфика генофондов	
	P_{95}	H_e	I	μ	h_{SSR}	h_{SSR}	R	КГО
<i>KAR</i>	0,854	0,163	0,252	1,696	0,152	0,218	0	1,513
<i>IRM</i>	0,896	0,208	0,313	1,756	0,122	0,165	0	1,423
<i>VSN</i>	0,922	0,208	0,320	1,775	0,112	0,177	0	0,796
<i>KUL</i>	0,888	0,186	0,285	1,722	0,139	0,198	0	1,479
<i>ZIL</i>	0,943	0,200	0,312	1,766	0,117	0,176	1	1,316
<i>KCH</i>	0,816	0,193	0,293	1,714	0,143	0,192	1	0,907
<i>BIL</i>	0,871	0,219	0,329	1,738	0,131	0,191	0	0,760
<i>POL</i>	0,747	0,153	0,231	1,620	0,190	0,153	0	0,995
<i>OSA</i>	0,769	0,165	0,250	1,642	0,179	0,195	0	1,153
<i>SKS</i>	0,778	0,185	0,277	1,672	0,164	0,196	0	0,809
<i>TUL</i>	0,771	0,153	0,235	1,618	0,191	0,161	0	0,811
<i>ISH</i>	0,817	0,167	0,256	1,655	0,173	0,152	0	0,890
<i>KRV</i>	0,804	0,169	0,259	1,693	0,153	0,215	0	0,581
<i>BND</i>	0,811	0,200	0,297	1,706	0,147	0,172	1	0,894
<i>GN</i>	0,872	0,202	0,304	1,762	0,119	0,202	0	0,673

Примечание: P_{95} — доля полиморфных локусов; H_e — ожидаемая гетерозиготность; I — информационный индекс Шеннона; μ — среднее число морф; h — доля редких морф; R — число уникальных аллелей; КГО — коэффициент генетической оригинальности.

Для характеристики внутривыборочного разнообразия важен не факт присутствия или отсутствия определенных аллелей, а их частотные соотношения. Частоты аллелей в равновесных популяциях характеризуется выровненным распределением. Преобладание аллелей с крайними частотами, встречаемость которых близка к 0 или 1, может быть вызвано ростом численности популяции после ее недавнего сокращения — эффект «бутылочного горлышка», при котором создаются условия для случайного варьирования частот аллелей в популяции — дрейфа генов [26]. Избыток аллелей с промежуточной частотой может быть следствием стабилизирующего отбора или популяционной структуры, характерной для обширных по площади популяций [27]. При анализе внутривыборочного разнообразия *L. sibirica* с применением показателя μ установлено, что из 15 изученных большей равномерностью распределения частот аллелей характеризуются выборки *VSN* и *ZIL* ($\mu = 1,775$ и $1,766$ соответственно), а наименьшей — *TUL* и *POL* ($\mu = 1,618$ и $1,720$ соответственно), в целом все выборки имеют средневысокие значения данного показателя (Таблица 3). Показатель доля редких морф (h) оценивает структуру внутривыборочного разнообразия, чем меньше значения h порогового (0,3) уровня, тем более сбалансированной структурой разнообразия характеризуются популяции [22]. У всех изученных выборок показатель h имеет значения меньше 0,3 (Таблица 3), наиболее сбалансированной структурой разнообразия характеризуется выборка *VSN* ($h = 0,112$), а наименее сбалансированной ($h = 0,191$ и $0,190$) выборки *TUL* и *POL* (Таблица 3). Для сравнения данных о внутривыборочном разнообразии, полученных с помощью двух типов ДНК-маркеров,

проведен расчет показателя h также на основании полиморфизма SSR–маркеров. Установлено, что наиболее сбалансированной структурой разнообразия по данному типу маркеров обладает выборка *ISH* ($h = 0,152$), а менее сбалансированной ($h = 0,218$ и $0,215$) — выборки *KAR* и *IRM* соответственно (Таблица 3).

Установленные при молекулярно-генетическом анализе параметры генетического разнообразия *L. sibirica* разделены на четыре группы (Таблица 3). К первой (1) группе относятся «Основные показатели генетического разнообразия», вторую группу (2) параметров генетического разнообразия составляют показатели внутривидового разнообразия, третья группа (3) характеризует генетическую структуру популяций (Таблица 3). Важной группой параметров генетического разнообразия является четвертая (4), так как характеризует «специфику» генофонда. Высокие значения КГО популяции свидетельствуют о повышенном присутствии редких для региона исследований аллелей и соответственно специфичности ее генофонда, а популяции с минимальным значением КГО имеют минимальные частоты и число редких аллелей. Такие популяции характеризуются наиболее типичным или базовым генофондом [6]. При характеристике специфичности генофондов необходимо учитывать не только значения КГО, но также присутствие и число уникальных аллелей в популяции, так как наличие таких аллелей может указывать на особенности структуры генетического разнообразия популяций. Для такой характеристики большое значение имеет число уникальных аллелей — R . Уникальные аллели, присутствующие только в одной из популяций и встречающиеся с заметной частотой (более 1%) характеризуют уникальность генофонда на популяционном уровне. Всего с использованием ISSR-метода было обнаружено 3 уникальных аллели (Таблица 3), по одной в выборках *ZIL*, *BND* и *KCH*, в остальных уникальных ISSR-маркерах не выявлено.

Наибольшей спецификой характеризуются генофонды выборок с Южного Урала, у которых за исключением выборки *ISN* (КГО=0,796) значения КГО больше единицы. Наибольшие значения КГО здесь отмечены в выборке *KAR* (1,513) из Карабашского района Челябинской области (Таблица 3). Данные выборки являются наиболее географически удаленными от основного уральского ареала распространения вида, а также характеризуются разной степенью изолированности вследствие приуроченности к горным массивам, окруженным лесостепными и степными сообществами, и хозяйственной освоенности региона. Вероятно, в связи с этим здесь распространяются и сохраняются нетипичные для региона исследования аллели.

Наименьшие значения КГО, а следовательно, более типичные генофонды, отмечены в североуральских выборках *L. sibirica*, располагающихся на севере Пермского края и границе с приполярным Уралом почти в центре района среднетаежных лесов, занимающих здесь огромные территории с непрерывным ареалом и практически не затронутые человеческой деятельностью, что делает беспрепятственным распространение генов на большие расстояния и сохранение типичной генетической структуры популяций вида. Наименьшие значения КГО здесь выявлены в выборке *KRV* (0,581) из Красновишерского района Пермского края (Таблица 3). Средними значениями КГО обладают среднеуральские выборки, которые вероятно подвержены влиянию потока генов из соседних регионов и содержат аллели как типичные, так и специфичные для уральского ареала распространения лиственницы (Таблица 3).

По результатам сравнительного анализа нами дана оценка состояния генофонда каждой выборки (Рисунок). Для оценки все избранные показатели генетического разнообразия переведены в разработанную на примере изученных природных популяций *L. sibirica* шкалу оценки состояния генофондов (Таблица 4). Данная шкала разработана на основе методики

оценки состояния генофондов ресурсных видов растений, базирующейся на применении ДНК-маркирования и количественных оценках параметров генетического разнообразия популяций [6, 24, 28]. Предлагаемая шкала оценки состояния генофондов приведена в Таблице 5. Значения одного-трех показателей могут незначительно отклоняться от указанных пределов. Шкала разработана на примере изучения популяций *L. sibirica* и может быть рекомендована для оценки состояния генофондов популяций и других хвойных видов растений после уточнения в связи с особенностями выборок и генофонда каждого вида. На основании данной шкалы установлено, что из всех 15 изученных на основании полиморфизма ISSR– и SSR-маркеров высокой степени удовлетворительное состояние (Ia) имеют генофонды выборок *ZIL*, *IRM* и *VSN*, в средней степени удовлетворительном (Iб) состоянии находятся генофонды семи выборок (*VSN*, *BIL*, *SKS*, *KCH*, *KUL*, *BND*, *GN*) *L. sibirica* (Рисунок 1, Таблица 3). В остальных выборках наблюдается тенденция к обеднению генофонда по отдельным параметрам (в основном это касается основных показателей и/или внутривыборочного разнообразия), их состояние оценено как средняя степень обеднения (IIa), наиболее подвержены обеднению генофонды двух выборок — *POL* и *TUL* (Рисунок, Таблица 3). Выборка *POL* характеризуется наиболее низкими значениями основных и внутривыборочных показателей генетического разнообразия. Кроме того при анализе частот распределения ISSR-маркеров установлено, что оно имеет U-образную форму. Такой тип распределения и снижение генетического разнообразия в данной популяции в значительной степени согласуется с ожидаемыми при генетическом дрейфе [26].

Таблица 4.

ШКАЛА ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ГЕНОФОНДОВ ПОПУЛЯЦИЙ *L. sibirica*

Состояние генофонда/показатель	P_{95}	He	I	μ	h_{ISSR}/h_{SSR}	R	КГО
I Удовлетворительное	>0,750	>0,170	>0,300	>1,650	<0,200		>0,900
Ia (высокая степень)	>0,820	>0,220	>0,350	>1,700	<0,150	> 2	>1,100
Iб (средняя степень)	0,750–0,820	0,170–0,220	0,300–0,350	1,650–1,700	0,200–0,150		0,900–1,100
II Обеднение генофонда	0,550–0,750	0,100–0,170	0,200–0,300	1,500–1,650	0,300–0,200		0,500–0,900
IIa (средняя степень)	0,650–0,750	0,130–0,170	0,250–0,300	1,550–1,650	0,250–0,200	1	0,700–0,900
IIб (сильная степень)	0,550–0,650	0,100–0,130	0,200–0,250	1,500–1,550	0,300–0,250		0,500–0,700
III Деградация генофонда	<0,550	<0,100	<0,250	<1,500	>0,300		с крайними интервалами
IIIa (средняя степень)	0,450–0,550	0,050–0,100	0,200–0,250	1,300–1,500	0,350–0,300	0	0,400–0,500
IIIб (сильная степень)	<0,450	<0,050	<0,200	<1,500	>0,350		<0,400

Примечание: P_{95} — доля полиморфных локусов; He — ожидаемая гетерозиготность; I — информационный индекс Шеннона; μ — показатель внутривыборочного разнообразия; h — доля редких морф; R — число уникальных аллелей; КГО — коэффициент генетической оригинальности

Вероятно, это обусловлено влиянием интенсивной хозяйственной деятельности в центральной части Пермского края и, как следствие, фрагментаций и изоляцией популяций *L. sibirica* в данном районе.

С целью сохранения генофонда ценного ресурсного вида растений *L. sibirica* рекомендуется отбирать как популяции с типичными (базовыми) генофондами, так и популяции, обладающие специфическими особенностями генофондов, являющиеся резервом

генетической изменчивости. Для отбора в качестве объектов сохранения могут быть рекомендованы популяции со специфическими генофондами, обладающие высоким уровнем генетического разнообразия. Например, такие как выборки *ZIL*, *KCH*, *IRM* и *BND* характеризующиеся высокими значениями КГО, обладающие уникальными аллелями и наибольшими показателями генетического разнообразия, которые могут являться, в том числе, носителями ценных в хозяйственном отношении генофондов (Рисунок). Кроме того, популяции с типичными генофондами и сбалансированной генетической структурой, например, *GN*, *BIL* и *VSN*, обладающие высокими показателями генетического разнообразия, которые могут быть использованы для сохранения базовых генофондов лиственницы сибирской. Особое внимание необходимо уделять так же популяциям, для которых характерно в целом обедненное состояние генофонда, особенно если в них обнаружены уникальные и редкие аллели, которые могут выступать как резерв генетической изменчивости. К ним в нашем исследовании можно отнести выборки *OSA*, *TUL*, *POL*, из которых также две выборки располагаются на территориях ООПТ, различного значения – выборка *TUL* находится на территории государственного заповедника «Вишерский» на высоте около 800 метров над уровнем моря и является самой северной и высокогорной из изученных, она характеризуется практически ненарушенной генетической структурой ($hISSR=0,191$; $hSNP=0,161$) и своеобразием генофонда и поэтому может быть использована для сохранения генофонда *L. sibirica* в горах.

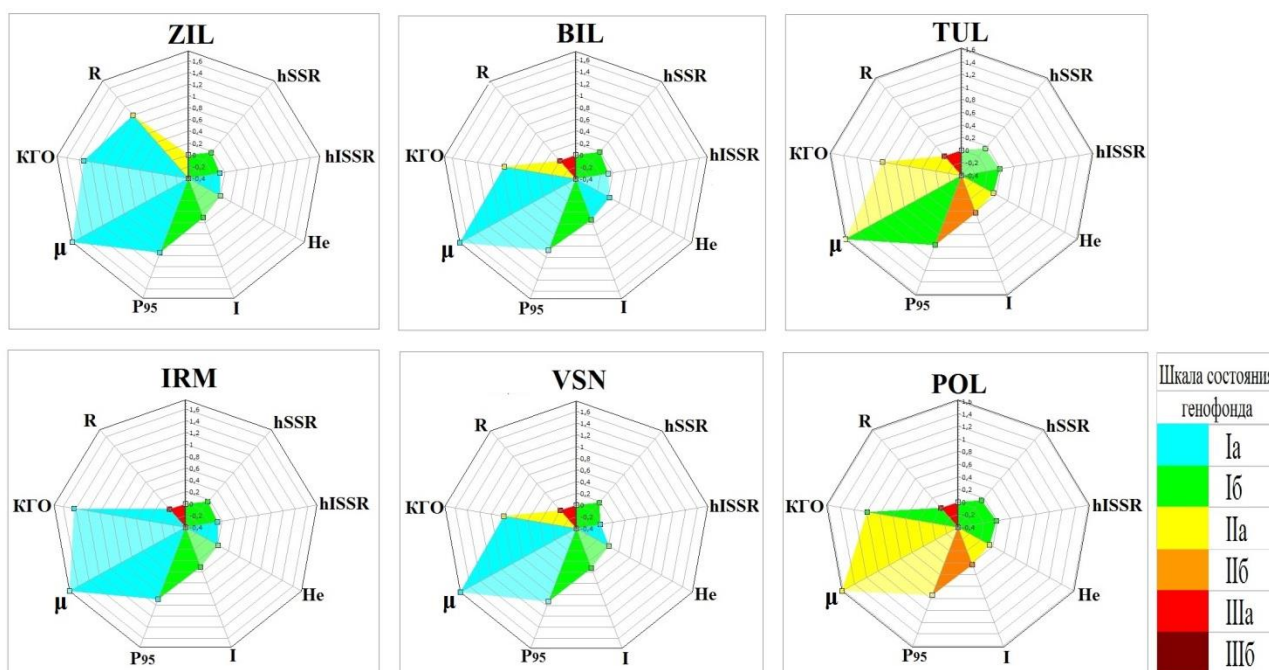


Рисунок. Оценка состояния генофондов на примере выборок *L. sibirica*; P_{95} , He , I , μ , $hISSR$, $hSSR$, R , KGO — показатели генетического разнообразия; справа — шкала оценки состояния генофондов

Таким образом, на основании данных о генетическом разнообразии, полученных с помощью двух типов молекулярных маркеров, установлено, что в удовлетворительном состоянии находятся генофонды десяти изученных популяций *L. sibirica*, а в пяти отмечены признаки обеднения генофонда. По итогам проведенного исследования можно дать следующие рекомендации по сохранению генетических ресурсов *L. sibirica* на Урале: для отбора популяций при сохранении генофондов вида необходимо проведение оценки их состояния на основании данных молекулярно-генетического анализа с использованием как

минимум двух типов молекулярных маркеров; для отбора в качестве объектов сохранения генофондов *L. sibirica* на Урале рекомендуются популяции с типичными и специфическими генофондами, а так же имеющие высокие уровни генетического разнообразия и сбалансированную генетическую структуру; особое внимание при сохранении генофонда вида необходимо уделять популяциям, которые могут выступать как резерв генетической изменчивости; для сохранения популяций, расположенных на территории ООПТ необходимо соблюдение мер охраны, предусмотренных статусом данных ООПТ. Изучение генетической изменчивости природных популяций древесных растений, и оценка состояния их генофондов могут быть использованы для составления генетически обоснованных программ по сохранению, восстановлению и рациональному использованию лесных генетических ресурсов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00348/19.

Список литературы:

1. Глобальная оценка лесных ресурсов - 2012 // Состояние лесов мира 2012 Рим: ФАО, 2012. 58 с. <http://www.fao.org/docrep/014/i1757r/i1757r.pdf>.
2. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года. <https://clck.ru/KwwsM>.
3. Путенихин В. П. Фенотипическая структура популяций дуба черешчатого в Башкирском Предуралье как основа сохранения генофонда вида в регионе // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. №3 (4). С. 1410-1412.
4. Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Топчиева Л. В., Рендаков Н. Л. Оценка генетического разнообразия популяций карельской березы в Карелии с помощью микросателлитных маркеров // Экологическая генетика. 2012. Т. 10. №1. С. 34-37. <https://doi.org/10.17816/ecogen10134-37>
5. Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 593 с.
6. Боронникова С. В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь, 2013. 223 с.
7. Вдовиченко Л. Г., Глазко В. И. Генетическая паспортизация сортов пшеницы с использованием ISSR-PCR маркеров // Сельскохозяйственная биология. 2007. №3. С. 33-37.
8. Семериков В. Л. Популяционная структура и молекулярная систематика видов *Larix Mill.*: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург, 2006. 42 с.
9. Дылис Н. В. Сибирская лиственница. Материалы к систематике, географии и истории. М., 1947. 137 с.
10. Семериков В. Л., Ирошников А. И., Ласко М. Структура изменчивости митохондриальной ДНК и послеледниковая история лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // Экология. 2007. №3. С. 163-171.
11. Путенихин В. П., Фарукшина Г. Г., Шигапов З. Х. Лиственница Сукачева на Урале: изменчивость и популяционно-генетическая структура. М.: Наука, 2004. 276 с.
12. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant molecular biology. 1985. V. 5. №2. P. 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
13. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. №2. P. 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

14. Litt M., Luty J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene // American journal of human genetics. 1989. V. 44. №3. P. 397. PMID: 2563634
15. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // Nucleic acids research. 1989. V. 17. №16. P. 6463-6471. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6463>
16. Нечаева Ю. С., Боронникова С. В., Юсупов Р. Р., Хайнце Б. Изучение полиморфизма ISSR-маркеров в природных и искусственных популяциях лиственницы // Фундаментальные исследования. 2013. №6. Ч. 6. С. 1426-1431.
17. Васильева Ю. С., Пришневская Я. В., Чертов Н. В., Жуланов А. А. Анализ генетического разнообразия и структуры популяций западной расы лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb. Урала на основе полиморфизма межмикросателлитных маркеров // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. №12. С. 113-124.
18. Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments // Nature biotechnology. 2000. V. 18. №2. P. 233. <https://doi.org/10.1038/72708>
19. Жуланов А. А. Исследование генетического разнообразия популяций западной расы *L. sibirica* с использованием микросателлитных маркеров // Симбиоз-Россия 2019: Материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием. Пермь, 2019. С. 118-120.
20. Wagner S., Gerber S., Petit R. J. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch) // Molecular ecology resources. 2012. T. 12. №4. P. 717-725. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03139.x>
21. Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia university press, 1987.
22. Животовский Л. А. Показатель внутривидового разнообразия // Журн. общ. биол. 1980. V. 41. №6. P. 828-836.
23. Боронникова С. В. Популяционно-генетический мониторинг генофондов редких ресурсных видов растений Пермского края // Флора Урала в пределах бывшей Пермской губернии и ее охрана: материалы межрегиональной конференции, посвященной 140-летию со дня рождения П. В. Сюзева. Пермь, 2007. С. 37-43.
24. Нечаева Ю. С., Жуланов А. А., Красильников В. П., Боронникова С. В. Оценка состояния генофондов популяций западной расы лиственницы сибирской *Larix sibirica* ledeb. (*L. sukaczewii*) на Среднем и Северном Урале // Современные проблемы науки и образования. 2016. №3. С. 393-398.
25. Потокина Е. К., Александрова Т. Г. Методы классификации внутривидового разнообразия по результатам молекулярного маркирования // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы Всероссийской конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 3. С. 62-65.
26. Wright S. Evolution in Mendelian populations // Genetics. 1931. V. 16. №2. P. 97. PMID: 17246615
27. Simonsen K. L., Churchill G. A., Aquadro C. F. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data // Genetics. 1995. V. 141. №1. P. 413-429. PubMed: 8536987
28. Боронникова С. В. Технология идентификации и оценки состояния генофондов растений // Аграрный вестник Урала. 2009. №8 (61). С. 71-73.

References:

1. Global Forest Resource Assessment (2012). In: *State of the world's forests 2012 Rome: FAO*. <http://www.fao.org/docrep/014/i1757r/i1757r.pdf>.

2. Kompleksnaya programma razvitiya biotekhnologii v Rossiiskoi Federatsii na period do 2020 goda. <https://clck.ru/KwwsM>.
3. Putenikhin, V. P. (2013). Phenotypic structure of quercus robur l. populations in bashkir cis-urals as a base of gene pool preservation of the species in the region. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 15(3), 1410-1412.
4. Vetchinnikova, L. V., Titov, A. F., Topchieva, L. V., & Rendakov, N. L. (2012). Estimation of genetic diversity of Karelian birch populations in Karelia using microsatellite markers. *Ecological Genetics*, 10(1), 34-37. <https://doi.org/10.17816/ecogen10134-37>
5. Khedrik, F. (2003). *Genetika populyatsii*. Moscow.
6. Boronnikova, S. V. (2013). Molekulyarno-geneticheskii analiz i otsenka sostoyaniya genofondov resursnykh vidov rastenii Permskogo kraya. Perm.
7. Vdovichenko, L. G., & Glazko V. I. (2007). ISSR-PCR markers in wheat variety passportization. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, (3), 33-37.
8. Semerikov, V. L. (2006). Populyatsionnaya struktura i molekulyarnaya sistematika vidov *Larix* Mill.: autoref. Dr. diss. Ekaterinburg.
9. Dylis, N. V. (1947). *Sibirskaya listvennitsa. Materialy k sistematike, geografii i istorii*. Moscow.
10. Semerikov, V. L., Iroshnikov, A. I., & Lasko, M. (2007). Mitochondrial DNA variation pattern and postglacial history of the Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.). *Russian Journal of Ecology*, 38(3), 147-154.
11. Putenikhin, V. P., Farukshina, G. G., & Shigapov, Z. Kh. (2004). Sukachev larch in the Urals: variability and population-genetic structure. Moscow.
12. Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*, 5(2), 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
13. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
14. Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397. PMID: 2563634
15. Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6463>
16. Nechaeva, Yu. S., Boronnikova, S. V., Yusupov, R. R., & Heinze, B. (2013). The Study of ISSR-markers Polymorphism in Natural and Cultural populations of Larch. *Fundamental Research*, (6), 1426-1431.
17. Vasileva, Yu., Prishnivskaya, Ya., Chertov, N., & Zhulanov, A. (2018). Analysis of genetic diversity and structure of Urals populations of Western Race of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) based on intermicrosatellite markers polymorphism. *Bulletin of Science and Practice*, 4(12), 113-124. (in Russian).
18. Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18(2), 233. <https://doi.org/10.1038/72708>
19. Zhulanov, A. A. (2019): Issledovanie geneticheskogo raznoobraziya populyatsii zapadnoi rasy *L. sibirica* s ispol'zovaniem mikrosatellitnykh markerov. In: *Simbioz-Rossiya Materialy XI Vseros. kongr. molodykh uchenykh-biologov s mezhd. uchastiem*. Perm, 118-120.

20. Wagner, S., Gerber, S., & Petit, R. J. (2012). Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular ecology resources*, 12(4), 717-725. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03139.x>
21. Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.
22. Zhivotovskii, L. A. (1980). Pokazatel' vnutripopulyatsionnogo raznoobraziya. *Zhurn. obshch. biol*, 41(6), 828-836.
23. Boronnikova, S. V. (2007). Populyatsionno-geneticheskii monitoring genofondov redkikh resursnykh vidov rastenii Permskogo kraja. In: *Flora Urala v predelakh byvshei Permskoi gubernii i ee okhrana: materialy mezhhregional'noi konferentsii, posvyashchennoi 140-letiyu so dnya rozhdeniya P. V. Syuzeva*. Perm, 37-43.
24. Nechaeva, Yu. S., Zhulanov, A. A., Krasil'nikov, V. P., & Boronnikova, S. V. (2016). Otsenka sostoyaniya genofondov populyatsii zapadnoi rasy listvennitsy sibirskoi *Larix sibirica* Ledeb. (*L. sukaczewii*) na Srednem i Severnom Urale. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, (3), 393-398.
25. Potokina, E. K., & Aleksandrova, T. G. (2008). Metody klassifikatsii vnutrividovogo raznoobraziya po rezul'tatam molekulyarnogo markirovaniya. In: *Fundamental'nye i prikladnye problemy botaniki v nachale XXI veka: materialy Vserossiiskoi konf. Petrozavodsk*, 3, 62-65.
26. Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97. PMID: 17246615
27. Simonsen, K. L., Churchill, G. A., & Aquadro, C. F. (1995). Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*, 141(1), 413-429. PubMed 8536987
28. Boronnikova, S. V. 2009. Tekhnologiya identifikatsii i otsenki sostoyaniya genofondov rastenii. *Agrarnyi vestnik Urala*, (8), 71-73.

Работа поступила
в редакцию 11.11.2019 г.

Принята к публикации
16.11.2019 г.

Ссылка для цитирования:

Васильева Ю. С., Сбоева Я. В., Чертов Н. В., Жуланов А. А. Оценка состояния генофонда западной расы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) Урала на основании полиморфизма микросателлитных маркеров // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5. №12. С. 98-110. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/11>

Cite as (APA):

Vasileva, Yu., Sboeva, Ya., Chertov, N., & Zhulanov, A. (2019). Estimation of the Gene Pool State of the Western Race of Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) in Urals on the Basis of Microsatellite Markers Polymorphism. *Bulletin of Science and Practice*, 5(12), 98-110. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/11> (in Russian).