

УДК 575

DOI: 10.25684/NBG.boolt.132.2019.09

**ПОДБОР ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ ВИДОВОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИСТВЕННИЦЫ ДАУРСКОЙ (ГМЕЛИНА) И
ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ, А ТАКЖЕ СРАВНЕНИЕ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПРОФИЛЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА**

**Елена Николаевна Амяга¹, Сергей Владимирович Нифонтов¹,
Александр Николаевич Гриднев², Николай Михайлович Макрушин³**

¹ Филиал ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Хабаровского края», 680007, г. Хабаровск,
ул. Волочаевская, 4

E-mail: czl127@rcfh.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Приморская государственная сельскохозяйственная академия», 692510,
г. Уссурийск, пр. Блюхера, 44

E-mail: gridnevan1956@mail.ru

³ Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52

E-mail: makruschin-nm@ukr.net

Сохранение и изучение генетического разнообразия видов лесных растений – одна из фундаментальных проблем современной ботаники, генетики и дендрологии. Особенно остро стоит вопрос об изучении на генетическом уровне ценных лесных пород с целью обеспечения их сохранности, видовой идентификации и контроля происхождения древесины. Одной из таких важных в экологическом и экономическом отношениях хвойных пород нашей страны является лиственница (*Larix*). В настоящее время существует проблема использования нерайонированных видов *Larix* для восстановления и воспроизводства лесов на территории России, и, в частности, на территории Дальнего Востока. В связи с этим подбор генетических маркеров, позволяющих выявить отличия между лиственницей даурской и лиственницей сибирской и их подвидами, является актуальной и востребованной задачей.

Ключевые слова: *лиственница; генетическая изменчивость; популяция; полиморфизм; микросателлитные локусы*

Введение

За последние десятилетия, благодаря развитию лесной генетики, осуществляются программы воспроизводства и восстановления природных популяций лесных пород, охарактеризована генетическая изменчивость хозяйственно-ценных видов и видов, находящихся под угрозой исчезновения. Разработка методов выявления полиморфизма ДНК и работа с генетическими маркерами позволяет вести мониторинг динамики генетического разнообразия. Самой распространенной и экономически значимой лесной породой на планете является лиственница (*Larix*). Ареал ее произрастания на территории России обширен – Урал, Западная Сибирь, Алтай, Саяны, Дальний Восток, Китай, северо-запад Монголии [1,2,3]. Ее древесина, благодаря прочности и устойчивости к гниению, используется в судостроении, строительстве гидротехнических сооружений, получении целлюлозы. Однако, генетика не всех видов лиственниц изучена в равной степени. Данных по генетике лиственницы сибирской в литературных источниках достаточно [4, 5, 6], определен набор ядерных микросателлитных локусов, позволяющий подробно исследовать внутривидовую

генетическую дифференциацию. Генетические процессы в популяциях лиственницы даурской не изучены, и существует ряд проблем, связанных с идентификацией подвидов и гибридных форм, выявлением генетического потенциала и устойчивости популяций [7]. Кроме того, в соответствии со статьей 65 Лесного Кодекса (ЛК), необходимо использовать посадочный материал «основных лесообразующих видов с учетом наследственных свойств и условий мест произрастания». Таким образом, основной целью исследования является подбор ядерных микросателлитных локусов для маркирования подвидов и популяций лиственницы даурской, а также сравнение генетических профилей лиственниц для решения задач лесного хозяйства.

Объекты и методы исследования

В представленной работе объектами изучения являлись лиственница даурская *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen. и лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.).

Для исследования отобрана хвоя из трех популяций лиственницы даурской: из Хабаровского края (лесничество Сукпайское, участковое лесничество Сукпайское) и 2 популяции лиственницы даурской из Еврейской автономной области (лесничество Биробиджанское, участковое лесничество Городское; лесничество Кульдурское, участковое лесничество Бираканское).

С целью видовой идентификации лиственницы были отобраны контрольные образцы семян лиственницы даурской (партия из Хабаровского края) в количестве 50 штук и лиственницы сибирской (партия из республики Хакасия) – 50 штук, а также проанализированы сеянцы (300 штук) и семена (150 штук) из питомников Хабаровского края на предмет наличия примеси нерайонированных видов лиственницы.

Выделение ДНК из хвои и семян проводили модифицированным СТАВ-методом [8,9]. Для выявления генетических особенностей и анализа полиморфизма популяций лиственницы даурской были отобраны ядерные микросателлитные локусы, отобранные ранее для лиственницы японской – группа bcLK [10,11]. Основные характеристики условий ПЦР и аллелей представлены в таблице 1.

Таблица 1

Перечень исследованных ядерных микросателлитных локусов для анализа полиморфизма лиственницы даурской

Локус	Число аллелей	Размер фрагмента	Температура отжига	Источник литературы
bcLK056	21	142-196 п.н.*	Touchdown 63 – 53° C	Isoda, Watanabe, 2006
bcLK066	8	143-157 п.н.*	Touchdown 63 – 53° C	Isoda, Watanabe, 2006
bcLK224	8	128-148 п.н.*	Touchdown 63 – 53° C	Isoda, Watanabe, 2006
bcLK232	8	133-149 п.н.*	Touchdown 63 – 53° C	Isoda, Watanabe, 2006
bcLK260	9	94-110 п.н.*	Touchdown 63 – 53° C	Isoda, Watanabe, 2006
bcLK235	21	172-220 п.н.*	58° C	Isoda, Watanabe, 2006
UACLy6	23	214-262 п.н.*	58° C	Khasa et al., 2000, 2006

*- пар нуклеотидов

Ядерные микросателлитные локусы, изменчивость которых была проанализирована для сравнения образцов лиственницы даурской и лиственницы сибирской, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика ядерных микросателлитных локусов, отобранных для сравнения *Larix gmelinii* и *Larix sibirica* [8, 12, 13]

Локус	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига	Размер фрагмента (Бондар, 2018)
Ls_1524449	FW: CGACAACACAGTCCATTTTCATC RV: ACATCTATTCCCCTCCCAATTC	Touchdown 60 – 51° C	179
Ls_951631	FW: GAAACATCGTGACTTCCTTTGA RV: CAACGAAACAATGGCTACAAAC	Touchdown 60 – 51° C	150
Ls_254200	FW: TTGTAATGCACCTTCAACTCCA RV: ACCATTTTGGGCAGTGTGTTG	Touchdown 60 – 51° C	252

ПЦР проведена с использованием набора лиофилизированных готовых реакционных смесей GenPakTM PCR Core (0.5 ml) производства ООО «Лаборатория Изоген» [12].

Визуализация ПЦР-продуктов проведена методом вертикального электрофореза в 5% полиакриламидном геле [2]. В качестве маркера стандартных длин использовалась ДНК плазмиды pBR322, обработанная рестриктазой Hra II.

Размер ампликонов определяли в программе Photo-Capt. Анализ полученных генотипов проводили в программе GenAlEx 6.2 [12].

Проведен анализ значений показателей F – статистик Райта. Оцененные параметры: F_{is} – значение коэффициентов инбридинга особей относительно популяции; F_{it} – значение коэффициентов инбридинга особи относительно вида; F_{st} – значение коэффициентов инбридинга популяции относительно вида.

Результаты и обсуждение

В рамках сравнительного анализа и выявления генетических особенностей лиственницы даурской выполнены исследования по 7 локусам с образцами хвои из трех популяций из Хабаровского края и ЕАО. Для всех проанализированных локусов характерен аллельный полиморфизм. Количество полученных аллельных вариантов у локуса bclK 066 при работе с дальневосточными видами лиственницы – 10, что превышает количество аллелей, указанное в литературном источнике [11] – 8. У локусов bcLK260 и UACLy6 количество полученных аллельных вариантов меньше у лиственницы даурской – 5 и 8 соответственно, вместо заявленных 21 и 23 для лиственницы японской [10, 11].

Наибольшее количество аллельных вариантов у локусов bclK 232 (13-15 аллелей), bclK 056 (11-13 аллелей). У остальных локусов полиморфизм сравнительно ниже. Количество аллелей и наиболее часто встречаемые варианты представлены на графике (рис. 1).

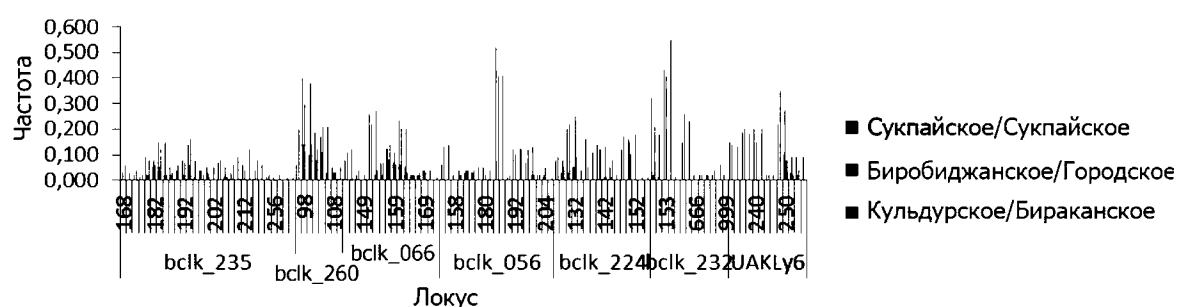


Рис. 1 Перечень аллельных вариантов в изученных популяциях *Larix gmelinii* из Хабаровского края и ЕАО

Несмотря на то, что идентифицированные ядерные микросателлитные локусы были общими, их аллельный состав отличался в трех популяциях. Максимальное аллельное разнообразие – 61 аллель отмечено в популяции лиственницы даурской из ЕАО (Биробиджанское/Городское), наименьшее – 55 аллелей – в популяции из Хабаровского края (Сукпайское/Сукпайское).

В таблице 3 приведены значения основных показателей генетической изменчивости, рассчитанные по 7 локусам в трех популяциях. Значение индекса фиксации Райта (характеризуют индивидуальный, субпопуляционный и популяционный уровни генетической структуры популяции) максимально у популяции из Хабаровского края (Сукпайское/Сукпайское) ($F=0,553$) и минимально у популяции из ЕАО (Биробиджанское/Городское) ($F=0,502$). Сравнительно, разница между показателями в пределах недостоверных различий. Сравнение наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности показало, что во всех трех популяциях отмечен дефицит гетерозиготных генотипов. Вероятно, это можно объяснить невысокой численностью популяций и самоопылением, приводящим к высокой степени инбридинга [4, 5, 6].

Таблица 3

Показатели генетической изменчивости лиственницы сибирской, рассчитанные в программе GenAlEx 6.2.

Популяции	N	Na	Ne	Ho	He	F
Сукпайское/Сукпайское	50	11.286	6.109	0.377	0.801	0.553
Биробиджанское/Городское	50	10.000	6.055	0.409	0.798	0.502
Кульдурское/Бираканское	50	11.143	6.435	0.403	0.818	0.522

N – выборка, Na – среднее число аллелей на локус, Ne – эффективно число аллелей на локус, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации.

Полученные в результате исследования значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о достаточно высоком уровне генетического разнообразия лиственницы даурской в анализируемых регионах и согласуются с результатами изучения в области изученных локусов у других видов *Larix* [6, 10, 11, 13].

Значения коэффициентов инбридинга особи относительно популяции F_{is} , инбридинга особи относительно вида F_{it} и инбридинга популяции относительно вида F_{st} , рассчитанные для каждого из анализируемых локусов лиственницы даурской, представлены в таблице 4.

Таблица 4

Значения показателей F – статистик Райта

Локус	F _{is}	F _{it}	F _{st}
bcl _k _235	0.879	0.886	0.057
bcl _k _260	0.710	0.717	0.025
bcl _k _066	0.139	0.182	0.050
bcl _k _056	0.778	0.806	0.125
bcl _k _224	0.164	0.106	0.050
bcl _k _232	0.831	0.863	0.186
UACLy6	0.508	0.548	0.081
Среднее значение	0.573±0.026	0.587±0.029	0.082±0.026

Коэффициент F_{is} варьирует от 0,139 (bcl_k_066) до 0,879 (bcl_k_260), составляя в среднем 0,573. Положительное среднее значение F_{is} указывает на 57% недостаток гетерозиготных генотипов. Коэффициент F_{it} также имеет положительное значение, средний показатель – 0,587, что указывает на 58% дефицит гетерозигот у вида в исследованной части ареала в целом. По показателю F_{st}, который отражает степень подразделенности популяций, выявлено, что 92% определенной в трех популяциях генетической изменчивости, реализуется внутри популяции, и только 8% (F=0,08) распределяется между популяциями. Наиболее важное значение для анализа межпопуляционной составляющей изменчивости имеют высокополиморфные локусы bcl_k_232 (F_{st} = 0,186) и bcl_k_056 (F_{st} = 0,125), наименьшее значение – bcl_k_260 (F_{st} = 0,025).

При подборе ядерных микросателлитных локусов для сравнения генетических профилей лиственницы даурской и лиственницы сибирской, а также их подвидов, проанализировали 19 локусов. Из них для видовой идентификации были отобраны лишь 5, с разными показателями для разных видов *Larix* (таблица 5) [2].

Таблица 5

Характеристика ядерных микросателлитных локусов, подобранных для видовой идентификации *Larix*

Локус	Показатели ядерных микросателлитных локусов	
	<i>Larix gmelinii</i> и ее подвиды	<i>Larix sibirica</i> и ее подвиды
UACLy6	214-262 п.н.	180-215 п.н.
bcLK232	133-149 п.н.	151-164 п.н.
Ls_1524449	нестабильные спектры с большим числом нуль-аллелей	высокополиморфный с 9 аллельными вариантами
Ls_951631	большой разброс в различии аллельных вариантов	полиморфизм
Ls_254200	слабая полиморфность	значительный полиморфизм, нестабильная амплификация

В результате анализа поступивших в лабораторию образцов семян и сеянцев в партиях из Хабаровского края и республики Хакасия, отмечено полное соответствие показателям длин и характеристик для ядерных микросателлитных локусов, указанных в таблице 5 для *Larix gmelinii* и *Larix sibirica* и их подвидов. На электрофореграммах представлены результаты детекции и генотипирования (рис. 2, 3, 4, 5, 6). При анализе 50 семян из питомника в Хабаровском крае четко определить вид не удалось, так как по локусам UACLy6, bcLK232 и Ls_254200 показатели были характерны для лиственницы

даурской и ее близкородственных видов, а по локусам Ls_1524449 и Ls_951631 результаты соответствовали показателям, характерным для лиственницы сибирской.

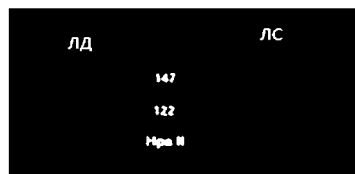


Рис. 2 Электрофореграмма локуса belk 232



Рис. 3 Электрофореграмма локуса UACLy6



Рис. 4 Электрофореграмма локуса Ls_951631

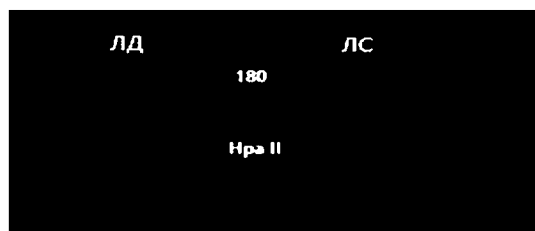


Рис. 5 Электрофореграмма локуса Ls_1524449



Рис. 6 Электрофореграмма локуса Ls_254200

Данная исследовательская работа является частью работ Российского центра защиты леса (РЦЗЛ) по созданию единой генетической базы данных основных лесобразующих пород.

Выводы

В результате исследования 3 популяций лиственницы из Хабаровского края и ЕАО, впервые дана оценка их межпопуляционной изменчивости на основе анализа ядерных микросателлитных локусов. Отмечены достоверные различия частот аллелей между выборками, а также значительный недостаток гетерозигот во всех трех популяциях, что подтверждает высокую степень инбридинга. Выявлены уникальные аллели для всех трех популяций по 7 проанализированным локусам, которые определяют специфику генетики популяции и определяют ее принадлежность к определенному району.

Отобраны локусы, отработаны праймеры к ним, по которым возможно выявить очевидные различия между лиственницей даурской и лиственницей сибирской и их подвидов, а также сравнить их генетические профили. Определены значения длин фрагментов ДНК, отмечены характерные показатели полиморфизма в области отобранных 5 локусов. На основе проведенного анализа выявили, что среди проанализированных семян и сеянцев лиственницы из питомников Хабаровского края нет образцов лиственницы сибирской, но в одной из партий семян присутствуют генетические признаки лиственницы даурской и лиственницы сибирской, что возможно, позволяет говорить о гибридном варианте. Такие исследования актуальны и позволяют в соответствии с законодательством Российской Федерации отслеживать

сохранность биологического материала, контролировать чистоту генофонда популяций основных лесообразующих пород и обеспечить их продуктивность.

Благодарность

За предоставленную информацию и помощь в исследовании авторы выражают благодарность Орешковой Н.В., кандидату биологических наук, научному сотруднику лаборатории лесной генетики и селекции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Бондар Е.И., магистру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет», Института фундаментальной биологии и биотехнологии, базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов.

Список литературы

1. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука, 1987. – 189 с.
2. Бондар Е.И. Разработка микросателлитных маркеров лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования: Автореф. магистр. дис.: 06.04.01 / Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2018. – 65 с.
3. Дылис Н. В. Лиственница. – М.: Лесн. пром-сть, 1981. – 96 с.
4. Орешкова Н.В. Аллозимный полиморфизм ферментов лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – Т. 25, № 1–2. – С. 160–167.
5. Орешкова Н.В. Изменчивость ядерных микросателлитных локусов у лиственниц Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) и камчатской (*Larix kamtchatica* (Rupr.) // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. 30, № 1–2. – С. 145–151.
6. Орешкова Н.В. Популяционно-генетические параметры лиственницы Гмелина в Восточном Забайкалье // Вестник ТГУ. – 2009. – № 328. – С. 193–198.
7. Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых Северной Евразии: Автореф. дис... докт. биол. наук: 03.00.15 / Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. – М., 2007. – 47 с.
8. Bousquet J., Simon L., Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction // Can. J. For. Res. – 1990. – V. 20. – P. 254–257.
9. Hamrick J.L. Response of forest trees to global environmental changes // Forest Ecology and Management. – 2004. – V. 197. – P. 323–335.
10. Isoda K. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Molecular Ecology. – 2006. – V. 6. – P. 664–666.
11. Khasa D.P., Jaramillo-Correa J.P., Jaquish B., Bousquet J. Contrasting microsatellite variation between sub-alpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns // Molecular Ecology. – 2006. – V.15, i. 13. – P. 3907–3918.
12. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. – V. 6. – P. 288–295.
13. Taheri S., Lee Abdullah T., Yusop M.R., Hanafi M.M., Sahebi M., Azizi P., Shamshiri R.R. Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants // Molecules. – 2018. – V. 23.

Статья поступила в редакцию 05.05.2019 г.

Amyaga E.N., Nifontov S.V., Gridnev A.N., Makrushin N.M. Selection of nuclear microsatellite loci for species identification of Daurian larch (Gmelin) and Siberian larch, as well as comparison of their genetic profiles for solving forestry problems // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2019. – № 132. – P. 72-79.

Preservation and study of forest plant species diversity is one of the fundamental challenges of modern botany, genetics, and dendrology. Genetic structure determines variability and controls adaptation mechanisms, let every population adapt to the environmental conditions. The most topical issue is genetic study of valuable forest species to ensure their integrity, specific identification and control over a wood origin. One of such environmentally and economically important coniferous species in our country is larch (*Larix*). Currently, there is a problem to use azonal larch species for reforestation in Russia, particularly in the Russian Far East. In this regard, selection of genetic markers that let us detect differences between Dahurian larch and Siberian larch and their subspecies is a crucial and relevant task.

Key words: *larch; genetic variability; population; polymorphism; microsatellite loci*

УДК 630*165

DOI: 10.25684/NBG.boolt.132.2019.10

ЛЕСНЫЕ ПЛЮСОВЫЕ НАСАЖДЕНИЯ И КРИТЕРИИ ИХ ОТБОРА

Анатолий Петрович Царев^{1,3}, Наталья Владимировна Лаур²

¹ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж

394087, Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д.105

Email: antsa_55@yahoo.com;

²ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

185000, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33

Email: laur@petrsu.ru

³Никитский ботанический сад-национальный научный центр,

298648 Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита

Представлен анализ состояния и тенденций развития селекции плюсовых насаждений (ПН) лесных древесных растений, которые являются важным компонентом лесосеменной базы страны. Оценены критерии их отбора и отмечены направления их унификации. Акцентируется внимание на необходимости активизации селекции новых ПН, указан их предпочтительный возраст, обязательность оставления защитных 100-метровых полос вокруг ПН при главных и промежуточных рубках, уточняются количественные показатели других критериев отбора ПН.

Ключевые слова: *плюсовые насаждения; постоянная лесосеменная база; критерии отбора плюсовых насаждений; лесообразующие древесные породы*

Введение

Плюсовые насаждения (ПН) – это высокопродуктивные, высококачественные и устойчивые для данных лесорастительных условий насаждения. Они могут рассматриваться как резерваты наиболее ценного генофонда основных лесообразующих пород и это одна из основных целей их селекции. Их выделяют и как семенные заказники. В некоторых случаях их регистрируют даже в качестве сортов-популяций. Но в этом случае необходимы исследования по географическому и экологическому их районированию [2, 4, 8, 9]. За рубежом на их базе начинали свою деятельность ряд крупных семеноводческих фирм.

ПН отбирают в основном в приспевающих (реже средневозрастных и спелых) высокобонитетных древостоях естественного, реже искусственного происхождения [5, 6, 13, 15]. Единых правил для отбора ПН нет, поэтому в зависимости от породы и целей