

ПОИСК НОВЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ХЛОРОПЛАСТНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ СИБИРСКОЙ КЕДРОВОЙ В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

В настоящее время для изучения истории формирования и генетического потенциала древесных видов растений, включая хвойные, широко применяются молекулярные цитоплазматические маркеры. У хвойных видов мтДНК передается по материнской линии и распространяется семенами [1], а распространение хлДНК идет по отцовской линии как за счет семян, так и за счет разносимой ветром пыльцы [2].

Маркеры митохондриального генома, благодаря более низкой подвижности, являются наиболее подходящими для выявления пространственно-генетической структуры популяций видов хвойных. Хлоропластные же микросателлиты имеют высокий уровень полиморфизма в связи с повышенной скоростью мутирования, а отсутствие рекомбинации у хлДНК позволяет выявлять недавно возникшие гаплотипы. В целом изменчивость митохондриального генома более структурирована по сравнению с хлоропластным. Совместное использование в генетических исследованиях двух типов цитоплазматических маркеров позволяют получить более полную картину истории расселения и дифференциации видов хвойных.

Применение цитоплазматических маркеров в отношении сосны сибирской кедровой (*Pinus sibirica* DuRoi) – одного из основных лесообразующих видов Западной Сибири, являющегося типичным представителем болотных и заболоченных экотопов – существенно затруднено из-за отсутствия разработанных высокоинформативных маркеров. В данной работе, результаты которой носят предварительный характер, предпринята попытка найти информативные маркеры мтДНК и хлДНК у *P. sibirica*, которые могли бы стать основой для выявления генетической дифференциации популяций данного вида и определения взаимосвязи между уровнем генетической изменчивости и эколого-географическими условиями их произрастания.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили выборки по 30 деревьев из 2 естественных на-

саждений (популяций) *P. sibirica*, произрастающих на болотах различных типов водно-минерального питания южно-таежной подзоны Западной Сибири (Томская область). Первое насаждение расположено в заторфованной долине р. Жуковка на глубоководном (7,6 м) евтрофном болоте (56 °20 гс.ш., 84 °34гв.д.) и представляет собой кедровник елово-лиственнично-пихтовый разнотравно-гипновый (состав древостоя 4К2Е1.5Л1П0.5С1Б; таксационная характеристика деревьев *P. sibirica*: высота 2–4 м, диаметр 4–6 см, возраст 36–52 лет). Второе насаждение произрастает в Междуречье Иксы и Бакчара на глубоководном (2,7 м) олиготрофном массиве (56 °53гс.ш., 82 °40г в.д.) и представляет собой сосняк сфагново-кустарничково-пушицевый в сочетании с куртинами и одиночными деревьями кедра (состав древостоя 8С2Кед.Б; таксационная характеристика деревьев *P. sibirica*: высота 4–7 м, диаметр 11–16 см, возраст 92–211 лет).

ПЦР-анализ проводили на базе отдела лесной генетики филиала ФБУ «Российский центр защиты леса», г. Красноярск.

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделяли с применением СТАВ-метода с некоторыми модификациями [3].

Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с пятью парами праймеров митохондриальной ДНК и девятнадцатью парами праймеров хлоропластной ДНК, которые были разработаны руководителем лаборатории лесной геномики Сибирского федерального университета (г. Красноярск), ведущим научным сотрудником Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (г. Москва), профессором генетики и геномики Гёттингенского (Германия) и Техасского агрономического (США) университетов К.В. Крутовским для сосны сибирской кедровой. Для этого из Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) были взяты все доступные сиквенсы хлоропластного генома (gi|228016112|gb|FJ899558.1| *Pinus sibirica* chloroplast, partial genome) и митохондриальных генов. С помощью программы SciRoKo

(<http://www.kofler.or.at/bioinformatics/SciRoKo/index.html>, <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/23/13/1683.full>) [4] были выявлены микросателлитные районы, и затем для них определены праймеры с помощью программы Primer3 (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Четыре микросателлитных локуса обнаружены в хлоропластном геноме и один среди изученных митохондриальных генов – в интроне (*nad1*; gi|12002773|gb|AF160260.1|).

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реагентов для амплификации ДНК «GenePakPCRCore» ООО «Лаборатория Изоген». Для микросателлитных локусов использовали следующий режим ПЦР: предварительная денатурация ДНК 94 °С в течение 1 мин., далее 10 циклов, включающие 30 сек. плавления при 94 °С, отжиг праймеров 30 сек. при 63–53 °С (–1 °С на каждый цикл) и 1 мин. элонгации при 72 °С, следующие 25 циклов состоят из 30 сек. плавления при 94 °С, отжиг праймеров 30 сек. при 53 °С и 1 мин. элонгации при 72 °С. Завершающий цикл элонгации проходил при 72 °С в течение 10 мин. [5]. Фрагменты анализировали с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды *E. coli* pBR322, обработанную эндонуклеазой рестрикции *HpaII*.

Результаты и обсуждение

В результате анализа пяти пар праймеров митохондриальной ДНК в двух природных популяциях сосны кедровой сибирской из различных районов естественного распространения в Томской области, отобрана пара с наилучшей амплификацией и для этого локуса выявлены два митотипа (табл.). Популяция *P. sibirica* с олиготроф-

ного болота оказалась фиксированной по одному митотипу, наиболее изменчивой же оказалась выборка из популяции с евтрофного болота.

По результатам тестирования праймеров для амплификации четырех хлоропластных локусов от одного пришлось отказаться из-за сложности амплифицированного спектра. Два локуса (табл.) оказались мономорфными в обеих популяциях, а третий – полиморфным с двумя аллелями. Всего по трем хлоропластным локусам выявлено два гаплотипа в двух популяциях сосны кедровой сибирской. Как и при анализе микросателлитных локусов мтДНК, более полиморфной оказалась популяция *P. sibirica* с евтрофного болота.

Для более точного генотипирования отобранных локусов необходима их амплификация с использованием праймеров с флуоресцентной меткой и последующим разделением ПЦР на генетическом анализаторе (секвенаторе) на основе капиллярного электрофореза (подобные работы были описаны в публикациях японских, китайских и итальянских исследователей для сосен *Pinus pumila* (Pall.) Regel, *Pinus parviflora* Siebold. et Zucc. var. *pentaphylla*, *Pinus cembra* L., *Pinus koraiensis* Siebold. et Zucc. [6–9]).

В будущем планируется продолжить поиск и более детальное изучение цитоплазматических маркеров для сосны кедровой сибирской.

Выводы

В результате проведенного исследования протестированы 24 пары ПЦР праймеров для амплификации и генотипирования одного митохондриального и трех хлоропластных цитоплазматических локусов для сосны сибирской кедровой. Более полиморфной оказалась популяция *P. sibirica* с евтрофного болота, по сравнению с популяцией данного вида с олиготрофного боло-

Таблица

Характеристика цитоплазматических маркеров, отобранных для сосны сибирской кедровой

Маркер	Сиквенсы форвард и реверс праймера (5'→3')	Размер фрагментов	Количество аллельных вариантов
P_sib_mt_SSR_CTAT_intron_nad1	AGGGGCTGTAGGTGATGATG GGCCTTGAAGGACCTTTTTC	236 240	2
P_sib_chl_SSR_TTCCC_noncoding_intraspace_psbA-tRNALys	TCCCAGGTTTTTGATAAGGA TCCTACTTCGGTTCGAAAGA	113	1
P_sib_chl_SSR_GTGATG_noncoding_intraspace_ycf1-rps15	TCTGATTTGATGAGGGCTGA TTTCCCAAATCAAGGGTCA	120	1
P_sib_chl_SSR_AT_noncoding_intraspace_tRNA_Val-rps4	TACGGTTCGAGCCCGTATAG CCATCGATCTCGATAAGGACA	141 143	2

та. Возможно, что при увеличении числа популяций в исследовании изменится и количество аллелей в локусах.

Авторы благодарят главного научного сотрудника Института леса им. В.Н. Сукачева, профессора С.П. Ефремова за помощь в подборе объектов исследования и выражают признательность научному руководителю центра геномных исследований Сибирского Федерального Университета, ведущему научному сотрудни-

ку Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, профессору Техасского агро-механического университета и Гёттингенского университета К. В. Крутовскому за консультации и помощь в интерпретации материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программ фундаментальных исследований Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и № 1.29 «Биоразнообразии природных систем».

ЛИТЕРАТУРА

1. Deverno L.L., Charest P.J., Bonen L. Inheritance of mitochondrial DNA in the conifer *Larix* // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – N 86. – P. 383–388.
2. Szmidt A.E., Alden T., Hallgren J.-E. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix* // *Plant Mol. Biol.* – 1987. – N 9. – P. 59–64.
3. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – 92, N 6. – P. 673–679.
4. Kofler R., Schluttenberger C., Lelley T. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation // *Bioinformatics.* – 2007. – 23, N 13. – P. 1683–1685.
5. Isolda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // *Molecular Ecology.* – 2006. – N 6. – P. 664–666.
6. Watano Y., Imazu M., Shimizu T. Spatial distribution of CpDNA and MtDNA haplotypes in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) // *Journal of Plant Research.* – 1996. – 109. – P. 403–408.
7. Gugerli F., Senn J., Anzidei M., Madaghiele A., Bächler U., Sperisen C., Vendramin G.G. Chloroplast microsatellites and mitochondrial nad1 intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*) // *Molecular Ecology.* – 2001. – N 10. – P. 1489–1497.
8. Chen M., Feng F., Sui X., Li M., Zhao D., Han S. Construction of a framework map for *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. using SRAP, SSR and ISSR markers // *Trees.* – 2010. – N 24. – P. 685–693.
9. Li Y., Liang L., Ge X. Development of microsatellite loci for *Pinus koraiensis* (Pinaceae) // *American Journal of Botany.* – 2010. – 97. – P. 39–41.
10. Genbank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
11. Primer 3 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>.
12. SciRoKo [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.kofler.or.at/bioinformatics/SciRoKo/index.html>.
13. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/23/13/1683.full>.

ORESHKOVA N.V., SEDEL'NIKOVA T.S., PIMENOV A.V.

Sukachev Institute of Forest SB RAS,

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

SEARCHING FOR NEW MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC STUDIES OF *PINUS SIBIRICA* IN WEST SIBERIA

Aims. Searching for informative markers of mtDNA and chlDNA in *Pinus sibirica*, which could become the basis for the identification of genetic differentiation of populations and determination of the relationship between the level of genetic variation and ecological and geographical conditions of their growth. **Methods.** PCR analysis with 5 pairs of primers of mtDNA and 19 pairs of primers of chlDNA was conducted. **Results.** 24 pairs of PCR primers for amplification and genotyping of one mitochondrial and three chloroplast cytoplasmic loci of *P. sibirica* were tested. **Conclusions.** When analyzing mtDNA and chlDNA microsatellite loci, population of *P. sibirica* on eutrophic bog has appeared more polymorphic than population of *P. sibirica* from oligotrophic bog.

Keywords: populations of *Pinus sibirica*, mtDNA, chlDNA, genetic polymorphism.