

УДК 575.2:575.22:574.3

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ И ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ В ПЕРМСКОМ КРАЕ НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-МАРКЕРОВ

Я. В. Сбоева¹, Ю. С. Васильева¹, Н. В. Чертов¹, Н. А. Пыстогова¹,
С. В. Боронникова¹, Р. Н. Календарь², Н. А. Мартыненко^{1,3}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

² Национальный центр биотехнологии
010000, Республика Казахстан, Нур-Султан, Кургальжинское шоссе, зд. 13/5

³ Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

E-mail: yana_prishnivskaya@mail.ru, yulianechaeva@mail.ru, syper.gall@mail.ru,
n.pystogova9@gmail.com, svboronnikova@yandex.ru, ruslan.kalendar@mail.ru,
nikita-martynenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2020 г.

Применение ДНК-маркирования лесообразующих древесных растений рассматривается как наиболее перспективный инструмент для генетического контроля географического происхождения древесины, формирования надежной системы управления заготовкой и оборотом пиломатериалов. Цель данной работы – определение идентификационных маркеров, генотипирование деревьев, а также молекулярно-генетическая идентификация ранее не изученных двух популяций лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb. и четырех популяций сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. из разных районов Пермского края. Для выделения ДНК с каждого растения индивидуально получали керны и применяли модифицированную методику выделения ДНК из древесины. Всего в анализе использовали ДНК 114 деревьев сосны обыкновенной и 55 деревьев лиственницы сибирской. Для генетического тестирования использовали ISSR-метод (Inter Simple Sequence Repeats) анализа полиморфизма ДНК. Генетическая идентификация проводилась на основании оригинальной авторской методики, предложенной С. В. Боронниковой и И. В. Бобошиной (2014). В результате молекулярно-генетического анализа в популяциях сосны обыкновенной обнаружены и проанализированы 74 ISSR-маркера, в популяциях лиственницы сибирской выявлено 85 ISSR-маркеров, доля полиморфных локусов в обоих видах оказалась высокой. В результате молекулярно-генетической идентификации обнаружены идентификационные видовые и полиморфные ISSR-маркеры и их сочетания, характеризующие принадлежность деревьев к виду, а также к определенной популяции. Составлены молекулярно-генетические формулы и штрихкоды для каждой отдельной популяции двух видов. Посредством анонимного тестирования доказаны эффективность, стабильность и воспроизводимость обнаруженных идентификационных маркеров и их сочетаний. Полученные данные являются основой для определения места происхождения древесины, что позволит рекомендовать меры противодействия нелегальной заготовке древесины и снизит ущерб бюджету лесозаготовительных регионов России, таких как Пермский край.

Ключевые слова: полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, ISSR-анализ, *Larix sibirica* Ledeb., *Pinus sylvestris* L., генетические формулы, штрих-коды.

DOI: 10.15372/SJFS20200405

© Сбоева Я. В., Васильева Ю. С., Чертов Н. В., Пыстогова Н. А., Боронникова С. В.,
Календарь Р. Н., Мартыненко Н. А., 2020

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение биологического разнообразия лесов как основы стабильности экосистем – важная задача нашего времени. Сбережение генетических ресурсов ценных видов древесных растений подразумевает изучение сформировавшейся популяционной структуры, т. е. соответствующего виду внутривидовой генно-разнообразия и генетической изменчивости. Несанкционированные рубки, ликвидируя часть генотипов, неизбежно ведут к генетическому обеднению популяций – сокращению генетического разнообразия (Ветчинникова и др., 2013).

Леса России занимают 22 % покрытой лесом площади Земли, более 50 % площади занимают хвойные леса (Аветов и др., 2011). Анализ состояния и динамики нарушений лесного законодательства с начала XXI в. показывает, что объемы незаконных рубок леса с каждым годом возрастают (Кузьмичев и др., 2018). Нелегальная заготовка древесины ежегодно наносит ущерб бюджету Российской Федерации на сумму, превышающую 11–12 млрд руб. (Чимидов, 2019). Пермский край в Приволжском федеральном округе занимает 1-е место по объемам лесных ресурсов (расчетная лесосека – 21 млн м³). За последние 7 лет в Пермском крае количество несанкционированных рубок снизилось в 1.5 раза, но при этом в несколько раз возросли объемы незаконно заготовленной древесины. В связи с этим край ежегодно теряет до 35.3 тыс. м³ древесины, а ежегодный ущерб в последние годы в среднем составляет ~0.5 млрд руб. (Пелявина, 2019).

При расследовании преступлений, связанных с незаконной заготовкой древесины, ведущей задачей является создание экспертной доказательной базы. Система учета оборота древесины включает контроль легальности ее заготовки. В связи с этим важно проведение идентификации популяций видов древесных растений для определения географического происхождения заготовленной древесины с целью определения легальности ее заготовки (Пальчиков и др., 2012). Предлагаются разнообразные варианты решения проблемы: традиционными методами маркировки являются клеймение молотком, краской-трейсером, ярлыками из бумаги или пластика со штрихкодом. Практика показывает, что 1–5 % ярлыков теряются при транспортировке и перегрузке. Химические метки могут быть индивидуальными, но они разлагаются при воздействиях среды и некоторых об-

работках. Генетический тест – это единственно возможный способ контроля древесины на всех этапах ее переработки (Degen et al., 2010; Vlam et al., 2018). Для разработки генетических маркеров необходимо провести фундаментальные исследования и поиск эффективных стабильных полиморфизмов различных структурных элементов геномов. В настоящее время применение ДНК-маркирования основных лесобразующих пород древесных растений рассматривается как основной инструмент для генетического контроля происхождения древесины и формирования современной системы управления лесонасаждениями (Комплексная программа..., 2012). В связи с этим разрабатываются различные методики, базирующиеся на использовании различных молекулярных маркеров (Degen et al., 2010; Шилкина и др., 2019). Для генетического теста в мировой научной практике чаще всего используются микросателлитные маркеры (SSR–Simple Sequence Repeats), имеющие много достоинств, в числе которых их кодоминантность. Однако микросателлитные маркеры высокомутабельны, и результаты такого маркирования не всегда воспроизводимы.

Предлагаемая в данном исследовании система молекулярно-генетической идентификации основана на поиске и анализе стабильных идентификационных молекулярных маркеров, а также включает универсальную форму их записи – молекулярно-генетические формулы и штрихкоды популяций, разработанные авторами. В основу генетического теста в данном случае предложены межмикросателлитные (ISSR) маркеры. Для создания ISSR-праймеров не требуется предварительного секвенирования и знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК, как в случае с SSR-маркированием. Кроме того, преимущество ISSR-маркеров – их полилокусность: данная методика позволяет анализировать одновременно до 150 локусов в геноме, т. е. обладает высокой производительностью и эффективностью (тогда как одна пара SSR-праймеров позволяет выявить полиморфизм только одного локуса), а также воспроизводимостью результатов, обеспечивая достоверность полученных данных. Для проведения анализа подходит обычная ПЦП и электрофорез, что значительно удешевляет процесс.

Одним из самых ценных видов древесных растений считается сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L. Этот вид занимает 2-е место (21.4 %) по площади среди насаждений хвойных древесных растений Пермского края (Лесной план...,

2018). Лиственница (род *Larix* Mill.) считается самой распространенной из основных лесобразующих пород в стране, ее древостоями занято больше 35.7 % всей площади территорий, покрытых лесами в РФ (Доклад..., 2016). В Пермском крае этот род представлен западной расой лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb., которая занимает площадь в 14 500 га, или 0.2 % от общей площади насаждений хвойных растений (Лесной план..., 2018). В настоящее время разработаны различные подходы генетического тестирования популяций лиственных растений, но не существует единой удобной методики для хвойных растений.

Цель работы – определение идентификационных маркеров, генотипирование деревьев, а также молекулярно-генетическая идентификация ранее не изученных популяций лиственницы сибирской и сосны обыкновенной в разных районах Пермского края.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали популяции двух видов хвойных растений, произрастающих в Пермском крае: две популяции лиственницы сибирской, расположенные вблизи г. Красновишерск (*Krv*) и в Осинском (*Osa*) районе; четыре популяции сосны обыкновенной: из Большесосновского (*BS*), Гаинского (*GN*), Пермского (*UK*) и Карагайского (*KR*) районов (рис. 1).

С использованием возрастного бура отобрали керны с 25–30 деревьев на расстоянии не менее 100 м в каждой из 6 исследованных популяций двух видов хвойных растений (табл. 1). Каждый керн поместили в отдельный стерильный,

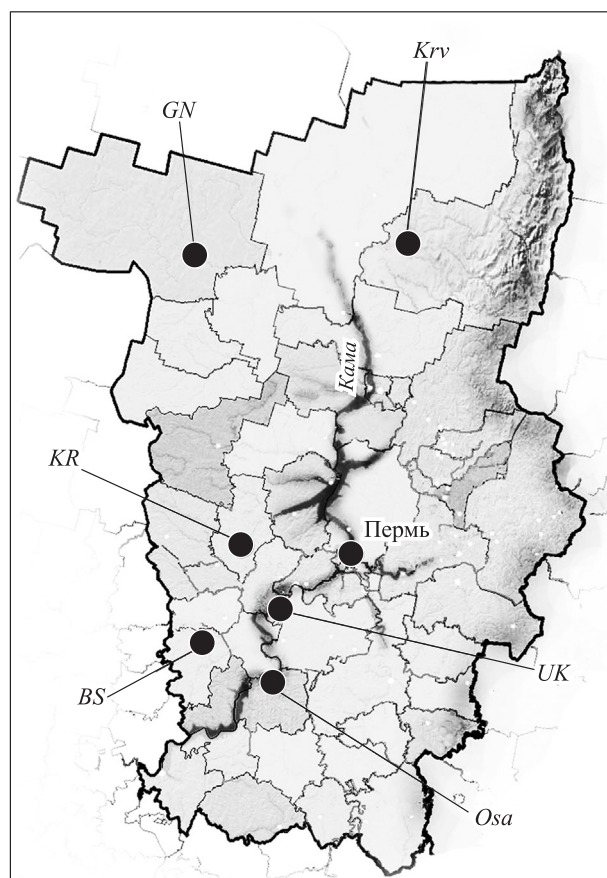


Рис. 1. Расположение выборок из популяций двух видов хвойных растений Пермского края. *Krv*, *Osa* – выборки лиственницы сибирской; *GN*, *BS*, *UK*, *KR* – выборки сосны обыкновенной.

плотно закрываемый бумажный пакет и маркировали. Препараты тотальной ДНК получали по способу выделения ДНК из растительного материала (Cota-Sanchez et al., 2006). В качестве модификации для выделения ДНК из древеси-

Таблица 1. Изученные популяции двух видов хвойных растений

Популяция	Расположение	Исследовано деревьев	Координаты
<i>Лиственница сибирская</i>			
<i>Krv</i>	Красновишерский район, Красновишерское лесничество	30	60°32'64"N 57°09'31"E
<i>Osa</i>	Осинский район, Осинское лесничество	25	57°34'30"N 55°25'68"E
<i>Сосна обыкновенная</i>			
<i>GN</i>	Большесосновский район, Очерское лесничество	29	57°53'17"N 54°41'78"E
<i>BS</i>	Гаинский район, Гаинское лесничество	30	60°31'49"N 54°28'69"E
<i>UK</i>	Пермский район, Пермское лесничество	25	57°68'16"N 55°46'70"E
<i>KR</i>	Карагайский район, Сивинское лесничество	30	58°33'60"N 54°95'88"E

ны воспользовались добавлением 3M раствора ацетата натрия, понижающего гидрофильность молекулы ДНК; на стадии осаждения ДНК изопропанолом – инкубирование (Groudeva, 2001) при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

Тотальная ДНК выделена у 114 деревьев сосны обыкновенной и 55 деревьев лиственницы сибирской. Для генетического тестирования был избран ISSR-метод (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz et al., 1994). Амплификацию проводили с праймерами, синтезированными в ЗАО «Синтол» (Москва) в амплификаторе GeneAmp PCRSystem 9700 (производитель Applied Biosystems, USA) по обычной для ISSR-метода программе (Zietkiewicz et al., 1994). Эффективные ISSR-праймеры, состав реакционной смеси, условия проведения электрофореза апробированы и представлены в предыдущих работах авторов (Пришневская и др., 2016, 2019; Васильева и др., 2018). Для сосны обыкновенной наиболее эффективными оказались следующие 5 ISSR-праймеров: $(AC)_8T$, $(CT)_8TG$, $(CA)_6GT$, $(GA)_8C$, $(AGC)_6C$, для лиственницы сибирской – $(CA)_6GT$, $(GAG)_6C$, $(AGC)_6C$, $(AGC)_6G$, $(AC)_8CT$. Для анализа продуктов амплификации их разделяли электрофорезом в 1.7 % агарозном геле в $1 \times TBE$ буфере (Tris-Borate-EDTA), окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации GelDoc XR («Bio-Rad», США). Для анализа использовали только воспроизводимые в повторных реакциях фрагменты, различия в интенсивности флюоресценции не учитывали. Полученные данные переведены в матрицу бинарных данных, где наличие или отсутствие на электрофореграмме равных по размеру фрагментов ДНК квалифицировалось в соответствии с этим как состояние 1 или 0. Долю полиморфных локусов рассчитывали при помощи макроса для MS Excel – GenAIEx 6.5

(Peakall, Smouse, 2012). Генетическая идентификация и генотипирование деревьев изученных хвойных растений осуществлены по методике, предложенной С. В. Боронниковой и И. В. Бобошиной (2014) на примере двух видов тополей *Populus L.*

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение генетического полиморфизма проведено у 114 проб ДНК сосны обыкновенной и у 55 проб ДНК лиственницы сибирской, при этом у сосны обнаружено 74 ISSR-маркера (8436 позиций матрицы), у лиственницы – 85 ISSR-маркеров (4685 позиций матрицы). В процессе амплификации с 5 ISSR-праймерами проб ДНК деревьев из четырех популяций сосны обыкновенной основной показатель доли полиморфных локусов (P_{95}) равнялся 0.950 (67 ISSR-маркеров из 74 полиморфны). Наименьший показатель P_{95} в исследуемых популяциях выявил праймер X10, наибольший – CR-215 (табл. 2).

Значение P_{95} среди рассматриваемых выборок максимально для популяции сосны обыкновенной из Гаинского района (*GN*) – 0.810, а минимально – в популяции Карагайского района ($P_{95} = 0.679$). Этот показатель (P_{95}) близок для обеих популяций лиственницы сибирской: 0.840 в *Osa*, 0.841 в *Krv* (табл. 3).

При идентификации популяций необходимо выявить редкие и даже уникальные маркеры, характерные только для одной популяции. В исследуемых популяциях сосны обыкновенной идентифицировано 12 уникальных маркеров, из них 9 присутствуют в популяции *KR*. В популяциях *BS*, *GN* и *UK* обнаружено по одному характерному для данной популяции ISSR-маркеру.

Среди популяций лиственницы сибирской выявлено 26 специфичных ISSR-маркеров, наи-

Таблица 2. Характеристика ISSR-маркеров четырех популяций сосны обыкновенной

ISSR-праймеры	Последовательность (5' → 3')	Число ISSR-маркеров в популяциях					На общую выборку	
		<i>BS</i>	<i>GN</i>	<i>UK</i>	<i>KR</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	
		<i>P</i>						
ISSR-1	$(AC)_8T$	6 (0.667)	9 (0.750)	6 (0.667)	5 (0.500)	14	12 (0.857)	
CR-212	$(CT)_8TG$	9 (0.818)	8 (0.800)	9 (0.818)	6 (0.667)	13	12 (0.923)	
CR-215	$(CA)_6GT$	12 (0.857)	14 (0.875)	11 (0.846)	13 (0.813)	19	18 (0.947)	
M27	$(GA)_8C$	9 (0.818)	10 (0.833)	8 (0.889)	8 (0.800)	13	12 (0.923)	
X10	$(AGC)_6C$	7 (0.700)	6 (0.750)	6 (0.667)	6 (0.545)	15	12 (0.800)	
Всего (частота)		43 (0.782)	47 (0.810)	40 (0.784)	38 (0.679)	74	67 (0.905)	

Примечание. Здесь и в табл. 3 *N* – общее число локусов; *P* – число полиморфных локусов, в скобках указана их доля.

Таблица 3. Характеристика ISSR-маркеров двух популяций лиственницы сибирской

ISSR-праймеры	Последовательность (5' → 3')	Число ISSR-маркеров в популяциях		На общую выборку	
		<i>Osa</i>	<i>Krv</i>	<i>N</i>	<i>P</i>
		<i>P</i>			
CR-215	(CA) ₆ GT	7 (0.636)	5 (0.714)	13	9 (0.692)
ISSR-8	(GAG) ₆ C	12 (0.857)	12 (0.857)	17	15 (0.882)
M3	(AGC) ₆ C	21 (0.913)	17 (0.895)	24	22 (0.917)
X10	(AGC) ₆ G	16 (0.941)	18 (0.947)	21	20 (0.952)
X11	(AC) ₈ CT	7 (0.700)	6 (0.750)	10	8 (0.800)
Всего (частота)		63 (0.840)	58 (0.841)	85	74 (0.871)

большее число которых идентифицировано в популяции *Osa* – 11, остальные 6 – в популяции *Krv*. Для видовой идентификации исследованных деревьев на электрофореграммах определяли мономорфные маркеры, которые присущи всем представителям вида в регионе исследования.

Для сосны обыкновенной обнаружено шесть видовых ISSR-маркеров, найденных у всех изученных выборок (рис. 2).

Маркеры обозначены в соответствии с методикой (Боронникова, Бобошина, 2014) следующим образом: PS_v370_{CR12}; PS_v260_{CR15}; PS_v290_{IS1}; PS_v380_{X10}; PS_v330_{X10}; PS_v360_{M27}. Для идентификации на популяционном уровне отобраны полиморфные маркеры (и их сочетания) с высокой частотой встречаемости (≥ 0.5), характерные для определенных популяций сосны обыкновенной. Таким образом, для исследованных популяций сосны обыкновенной найдено 16 идентификационных ISSR-маркеров, из них 9 полиморфных, характеризующих отдельные популяции (табл. 4). Для популяций лиственницы сибирской детектированы 11 видовых ISSR-маркеров.

Для идентификации популяций лиственницы отобрано 4 полиморфных ISSR-маркера с

высокой частотой встречаемости, позволяющие идентифицировать принадлежность выборки к одной из изученных популяций лиственницы сибирской (см. табл. 4, рис. 2).

В двух популяциях лиственницы сибирской детектировано 15 идентификационных ISSR-маркеров, 4 из которых полиморфные. В исследовании с помощью обнаруженных при анализе идентификационных маркеров при обобщении и систематизации данных созданы составные генетические формулы (с указанием фрагментов) изученных популяций двух видов хвойных растений (табл. 5).

Результаты идентификации согласно методике представлены в виде штрихкода, характерного для каждой из изученных популяций сосны обыкновенной и лиственницы сибирской (рис. 3).

Для апробации разработанной системы идентификационных маркеров изученных популяций двух видов проведена анонимная идентификация неизвестных проб ДНК (случайной выборки одного из двух исследованных видов) на основании анализа идентификационных маркеров.

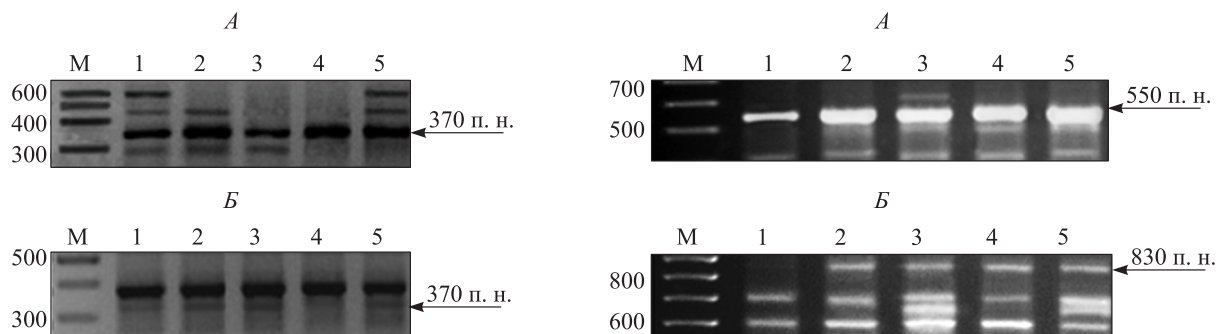


Рис. 2. Фрагменты ISSR-спектров с некоторыми идентификационными маркерами двух видов: 1 – сосна обыкновенная (А – видовой маркер PS_v370_{CR12} на фореграмме популяции *GN* с праймером CR-212; Б – полиморфный маркер PsUK_p310_{X10} популяции *UK* с праймером X10); 2 – лиственница сибирская (А – видовой маркер LS_v550_{ISSR-8} на фореграмме популяции *Osa* с праймером ISSR-8; Б – полиморфный маркер LsOsa_p830_{M3} популяции *Osa* с праймером M3); М – маркер молекулярной массы, 1–5 – номера проб ДНК, слева указана молекулярная масса фрагментов в п. н., стрелками обозначен идентификационный маркер.

Таблица 4. ISSR-маркеры, избранные для идентификации изученных популяций двух видов хвойных растений

Праймаер	Идентификационные маркеры сосны обыкновенной	Праймаер	Идентификационные маркеры лиственницы сибирской
<i>Мономорфные</i>			
CR-212	PS _v 370 _{CR12}	CR-215	LS _v 420 _{CR-215} ; LS _v 290 _{CR-215} ; LS _v 255 _{CR-215} ; LS _v 190 _{CR-215}
CR-215	PS _v 260 _{CR15}	ISSR-8	LS _v 550 _{ISSR-8} ; LS _v 340 _{ISSR-8}
ISSR-1	PS _v 290 _{IS1}	M3	LS _v 600 _{M3} ; LS _v 500 _{M3}
X10	PS _v 380 _{X10} ; PS _v 330 _{X10}	X10	LS _v 370 _{X10}
M27	PS _v 360 _{M27}	X11	LS _v 280 _{X11} ; LS _v 220 _{X11}
<i>Полиморфные</i>			
CR-212	PsUK _p 770 _{CR12} ; PsKR _p 750 _{CR12} ; PsUK _p 400 _{CR12}	M3	LsOsa _p 830 _{M3}
CR-215	PsKR _p 250 _{CR15}	X10	LsKrv _p 670 _{X10} ; LsKrv _p 590 _{X10}
ISSR-1	PsKR _p 1350 _{CR15} ; PsGN _p 420 _{IS1} ; PsGN _p 240 _{IS1} ; PsGN _p 220 _{IS1}	X11	LsOsa _p 460 _{X11}
X10	PsKR _p 1000 _{X10} ; PsUK _p 310 _{X10} ; PsBS _p 200 _{X10}		

Примечание. PS_v – видовые маркеры сосны обыкновенной; LS_v – видовые маркеры лиственницы сибирской; PsUK_p, PsBS_p, PsGN_p – полиморфные ISSR-маркеры и их сочетания, идентифицирующие отдельные популяции *P. sylvestris*; LsKRV_p, LsOSA_p – полиморфные ISSR-PCR- маркеры и их сочетания, идентифицирующие отдельные популяции лиственницы сибирской.

Таблица 5. Молекулярно-генетические формулы для идентификации изученных популяций двух видов хвойных растений

Популяция	Тип ISSR-маркеров	Молекулярно-генетическая формула
<i>Сосна обыкновенная</i>		
BS	vid	PS _v 380 _{X10} ; PS _v 370 _{CR12} ; PS _v 360 _{M27} ; PS _v 330 _{X10} ; PS _v 290 _{IS1} ; PS _v 260 _{CR15}
	polimorph	PsBS _p 200 _{X10}
GN	vid	PS _v 380 _{X10} ; PS _v 370 _{CR12} ; PS _v 360 _{M27} ; PS _v 330 _{X10} ; PS _v 290 _{IS1} ; PS _v 260 _{CR15}
	polimorph	PsGN _p 630 _{M27} ; PsGN _p 420 _{IS1} ; GN _p 240 _{IS1} ; PsGN _p 220 _{IS1}
UK	vid	PS _v 380 _{X10} ; PS _v 370 _{CR12} ; PS _v 360 _{M27} ; PS _v 330 _{X10} ; PS _v 290 _{IS1} ; PS _v 260 _{CR15}
	polimorph	PsUK _p 400 _{CR12} ; PsUK _p 310 _{X10}
KR	vid	PS _v 380 _{X10} ; PS _v 370 _{CR12} ; PS _v 360 _{M27} ; PS _v 330 _{X10} ; PS _v 290 _{IS1} ; PS _v 260 _{CR15}
	polimorph	PsKR _p 1350 _{CR15} ; PsKR _p 1000 _{X10} ; PsKR _p 750 _{CR12} ; PsKR _p 250 _{CR15}
<i>Лиственница сибирская</i>		
Osa	vid	LS _v 600 _{M3} ; LS _v 550 _{ISSR8} ; LS _v 500 _{M3} ; LS _v 420 _{CR-215} ; LS _v 370 _{X10} ; LS _v 340 _{ISSR8} ; LS _v 290 _{CR215} ; LS _v 280 _{X11} ; LS _v 255 _{CR215} ; LS _v 220 _{X11} ; LS _v 190 _{CR215}
	polimorph	LsOSA _p 830 _{M3} ; LsOSA _p 460 _{X11}
Krv	vid	LS _v 600 _{M3} ; LS _v 550 _{ISSR8} ; LS _v 500 _{M3} ; LS _v 420 _{CR-215} ; LS _v 370 _{X10} ; LS _v 340 _{ISSR8} ; LS _v 290 _{CR215} ; LS _v 280 _{X11} ; LS _v 255 _{CR215} ; LS _v 220 _{X11} ; LS _v 190 _{CR215}
	polimorph	LsKRV _p 670 _{X10} ; LsLsKRV _p 590 _{X10}

Примечание. Vid – видовые; polymorph – полиморфные.

При сравнении ISSR-паттернов исследованной ранее популяции и 20 неизвестных образцов ДНК выявлены видовые маркеры сосны обыкновенной, а также маркеры принадлежности к выборке GN, следовательно, данные не-

известные тестируемые образцы принадлежат популяции GN сосны обыкновенной с молекулярно-генетической формулой PsGN_p630_{M27}; PS_v450_{CR12}; PsGN_p420_{IS1}; PS_v380_{X10}; PS_v370_{CR12}; PS_v360_{M27}; PS_v330_{X10}; PS_v290_{IS1}; PS_v260_{CR15};

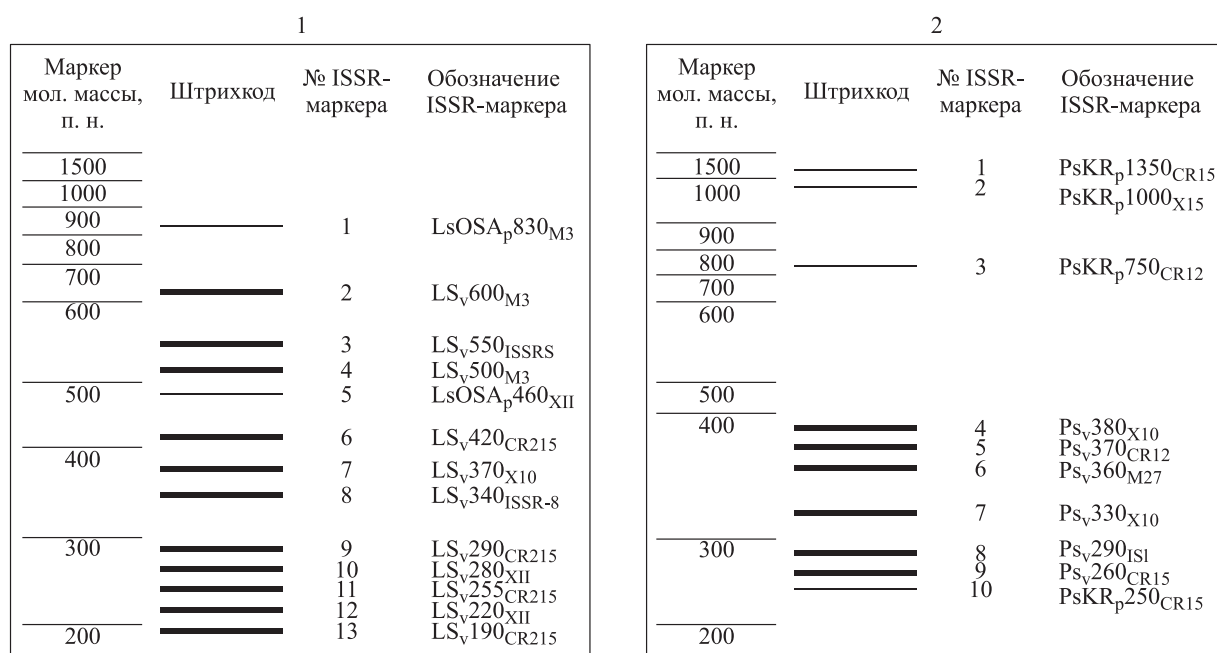


Рис. 3. Примеры молекулярно-генетических штрихкодов изученных популяций двух видов: 1 – популяции *Osa* лиственницы сибирской, 2 – популяции *KR* сосны обыкновенной; п. н. – пар нуклеотидов.

PsGN_p240_{ISI}; PsGN_p220_{ISI}. Для 20 неизвестных образцов лиственницы сибирской также проведено анонимное тестирование, подтвердившее принадлежность анонимных образцов к популяции *Osa* с молекулярно-генетической формулой LsKRV_p670_{X10}; LS_v600_{M3}; LsLsKRV_p590_{X10}; LS_v550_{ISSR8}; LS_v500_{M3}; LS_v420_{CR-215}; LS_v370_{X10}; LS_v340_{ISSR8}; LS_v290_{CR215}; LS_v280_{X11}; LS_v255_{CR215}; LS_v220_{X11}; LS_v190_{CR215}.

Итак, для шести популяций двух хвойных видов растений (сосны обыкновенной и лиственницы сибирской) составлены генетические формулы и штрихкоды, которые наглядно позволяют представить результаты генетической идентификации на популяционном уровне. Для подтверждения эффективности системы идентификационных маркеров выполнено анонимное тестирование неизвестных образцов ДНК отдельно двух изученных видов хвойных растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические исследования шести популяций двух ценных лесообразующих видов сосны обыкновенной и лиственницы сибирской, произрастающих в Пермском крае, позволили оценить их генетическое разнообразие. Определено, что доля полиморфных локусов как один из основных показателей генетической гетерогенности у обследованных

популяций достаточно высока, поэтому анализ выявленных молекулярных маркеров может быть применен для идентификации популяций. У шести популяций двух видов хвойных растений детектированы видовые ISSR-маркеры для определения образца до вида, а для каждой из исследованных популяций выявлены идентификационные маркеры, позволяющие определить принадлежность к популяции. При этом идентификация осуществлялась по сочетаниям уникальных и видоспецифичных ISSR-маркеров, имеющих высокую частоту встречаемости. Процедура идентификации популяций предусматривает молекулярно-генетический анализ, в данном случае на основании полиморфизма ISSR-маркеров. Следующий этап – выявление идентификационных маркеров, а также редких аллелей. На заключительном этапе формируются молекулярно-генетические формулы, а на их основе – штрихкоды для каждой из обследованных популяций. Эффективность установленных идентификационных маркеров подтверждена в результате анонимного тестирования неизвестных образцов ДНК.

Таким образом, проведенная идентификация некоторых популяций сосны обыкновенной и лиственницы сибирской Пермского края показала, что полученные ДНК-маркеры и их сочетания являются специфичными для вида и изученных популяций, стабильными и воспроизводимыми. Это дает возможность дальнейшего изучения

взаимосвязи генетических и географических характеристик изученных видов хвойных растений, а также позволяет определить место происхождения древесины. Внедрение системы генетической идентификации будет способствовать разработке мер борьбы с незаконной заготовкой древесины и уменьшит ущерб лесным экосистемам, а также бюджету исследованных регионов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/174.3 от 31.01.2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES)

- Аветов Н. А., Александровский А. Л., Алябина И. О., Ананко Т. В., Барсова Н. Ю., Бирюков М. В., Бирюкова О. Н., Богатырев Л. Г., Богданова М. Д., Булгаков Д. С., Быкова Е. П., Быховец С. С., Вандышева Н. М., Васильевская В. Д., Вильчевская Е. В., Владыченский А. С., Волкова Е. А., Востокова Л. Б., Гиличинский Д. А., Глазовская М. А., Горячкин С. В., Градусов Б. П., Губин С. В., Гуров А. Ф., Деева Н. Ф., Демидов В. В., Демин В. В., Добровольский Г. В., Есафова Е. Н., Загородняя Ю. А., Зборищук Ю. Н., Иванов А. В., Ильина А. А., Карманов И. И., Карпова Е. А., Каштанов А. Н., Ковалева Н. О., Колесникова В. М., Конюшков Д. Е., Кречетов П. П., Кузнецов А. В., Кузнецов М. С., Куст Г. С., Лебедева-Верба М. П., Маречек М. С., Мартыненко И. А., Мартынов А. С., Митенко Г. В., Моисеев Б. Н., Мотузова Г. В., Назырова Р. И., Неведова Т. Г., Оглеznev А. К., Очагов Д. М., Пиковский Ю. И., Погожева Е. А., Попов П. Д., Потанова Н. А., Присяжная А. А., Прокофьева Т. В., Решоткин О. В., Рухович Д. И., Сапожников П. М., Снакин В. В., Соколова Т. А., Сорокина Н. П., Сороковиков В. А., Таргулян В. О., Тихонравова П. И., Тишкова А. А., Урусевская И. С., Федорова И. Т., Христанов В. Р., Худяков О. И., Чернова О. В., Шарый П. А., Шоба С. А., Юрковская Т. К., Январева Л. Ф. Национальный атлас почв Российской Федерации. М.: Астрель, 2011. 632 с. [Avetov N. A., Aleksandrovskiy A. L., Alyabina I. O., Ananko T. V., Barsova N. Yu., Biryukov M. V., Biryukova O. N., Bogatyrev L. G., Bogdanova M. D., Bulgakov D. S., Bykova E. P., Bykhovets S. S., Vandysheva N. M., Vasil'evskaya V. D., Vil'chevskaya E. V., Vladychenskiy A. S., Volkova E. A., Vostokova L. B., Gilichinskiy D. A., Glazovskaya M. A., Goryachkin S. V., Gradusov B. P., Gubin S. V., Gurov A. F., Deeva N. F., Demidov V. V., Demin V. V., Dobrovolskiy G. V., Esafova E. N., Zavgorodnyaya Yu. A., Zborishchuk Yu. N., Ivanov A. V., Il'ina A. A., Karmanov I. I., Karpova E. A., Kashtanov A. N., Kovaleva N. O., Kolesnikova V. M., Konyushkov D. E., Krechetov P. P., Kuznetsov A. V., Kuznetsov M. S., Kust G. S., Lebedeva-Verba M. P., Marechek M. S., Martynenko I. A., Martynov A. S., Mitenko G. V., Moiseev B. N., Motuzova G. V., Nazyrova R. I., Nefedova T. G., Ogleznev A. K., Ochagov D. M., Pikovskiy Yu. I., Pogozeva E. A., Popov P. D., Potanova N. A., Prisyazhnaya A. A., Prokof'eva T. V., Reshotkin O. V., Rukhovich D. I., Sapozhnikov P. M., Snakin V. V., Sokolova T. A., Sorokina N. P., Sorokovikov V. A., Targulyan V. O., Tikhonravova P. I., Tishkov A. A., Urusevskaya I. S., Fedorova I. T., Khrisanov V. R., Khudyakov O. I., Chernova O. V., Shary P. A., Shoba S. A., Yurkovskaya T. K., Yanvareva L. F. Natsionalny atlas pochv Rossiyskoy Federatsii (National Atlas of Soils of the Russian Federation). Moscow: Astrel, 2011. 632 p. (in Russian)].
- Боронникова С. В., Бобошина И. В. Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений. Патент на изобретение РФ № 2505956. Бюл. изобр., 2014. № 4. 10 с. [Boronnikova S. V., Boboshina I. V. Sposob molekulyarno-geneticheskoy identifikatsii populyatsiy drevesnykh vidov rasteniy. Patent na izobretenie RF N. 2505956 (Method of molecular-genetic identification of woody plant species populations. Patent for the invention of the Russian Federation N. 2505956). Bull. invent. 2014. N. 4. 10 p. (in Russian with English abstract)]. https://patentimages.storage.googleapis.com/01/ff/bc/382e30adce201a/RU_2505956C2.pdf
- 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 // Бюл. науки и практики. 2018. Т. 4. № 12. С. 113–124 [Vasil'eva Yu. S., Prishnivskaya Ya. V., Chertov N. V., Zhulananov A. A. Analiz geneticheskogo raznoobraziya i struktury populyatsiy zapadnoy rasy listvennitsy sibirskoy *Larix sibirica* Ledeb. Urala na osnove polimorfizma mezhmikrosatellitnykh markerov (Analysis of genetic diversity and structure of Urals populations of western race of the Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) based on polymorphism of intermicrosatellite markers) // Byul. nauki i praktiki (Bull. Sci. and Practice). 2018. V. 4. N. 12. P. 113–124 (in Russian with English abstract)].
- Ветчинникова Л. В., Тутов А. Ф., Кузнецова Т. Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: Карел. науч. центр РАН, 2013. 312 с. [Vetchinnikova L. V., Titov A. F., Kuznetsova T. Yu. Karelskaya bereza: biologicheskie osobennosti, dinamika resursov i vosproizvodstvo (Curly birch: biological characteristics, resource dynamics, and reproduction). Petrozavodsk: Karel. nauch. tsentr RAN (Karel. Sci. Center Rus. Acad. Sci.), 2013. 312 p. (in Russian with English title and summary)].
- Доклад о состоянии и использовании лесов РФ за 2015 г. от 20 декабря 2016 г. [Doklad o sostoyanii i ispol'zovanii lesov RF za 2015 g. ot 20 dekabrya 2016 g. (Report on the state and use of forests of the Russian Federation for 2015 dated December 20, 2016) (in Russian)]. <http://oldsite.zapoved.ru/regulatory/detail.php?ID=254471>
- Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. ВП-П8-2322. Утв. Правительством РФ 24.04.2012 г. № 1853п-П8 [Kompleksnaya programma razvitiya biotekhnologiy v Rossiyskoy Federatsii na period do 2020 g. VP-P8-2322. Utv. Pravitel'stvom RF 24.04.2012 g. N. 1853p-P8 (Complex program for the development of biotechno-

- logy in the Russian Federation for the period until 2020. VP-P8-2322. Government-approved of the Russian Federation on 24.04.2012 N. 1853p-P8) (in Russian)]. http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_130043/
- Кузьмичев Е. П., Трушина И. Г., Лопатин Е. В. Объемы незаконных рубок лесных насаждений в Российской Федерации // Лесохозяйственная информация: электрон. сетевой журн. 2018. № 1. С. 63–77 [Kuzmichev E. P., Trushina I. G., Lopatin E. V. Ob'emy nezakonnnykh rubok lesnykh nasazhdeniy v Rossiyskoy Federatsii (Volumes of illegal forest logging in the Russian Federation) // Lesokhozyaistvennaya informatsiya: elektron. setevoy zhurn. (For. Inform.: electronic online J.). 2018. N. 1. P. 63–77 (in Russian with English abstract)]. http://lhi.vniilm.ru/PDF/2018/1/LHI_2018_01-06-Kuzmichev.pdf
- Лесной план Пермского края на 2018–2027 г. (с изменениями по форме, утвержденной приказом Мин-ва природ. ресурсов и экологии Российской Федерации от 20 декабря 2017 г. № 692). Утв. указом губернатора Пермского края от 19.04.2018 г. № 36 [Lesnoy plan Permskogo kraya na 2018–2027 g. (s izmeneniyami po forme, utverzhdennoi prikazom Ministerstva prirodnnykh resursov i ekologii Rossiyskoy Federatsii ot 20 dekabrya 2017 g. N. 692). Utv. ukazom gubernatora Permskogo kraya ot 19.04.2018 g. N. 36 (The forest plan of the Perm Krai for 2018–2027 (with changes in the form approved by the order of the Ministry of Natural Resources and Ecology of the Russian Federation of December 20, 2017 N. 692). Approved by the decree of the Governor of the Perm Krai of April 19, 2018 N. 36) (in Russian)]. https://prigoda.permkrai.ru/timberrow/les_plan/Лесной%20план%20Пермского%20края%20на%202018-2027%20годы.pdf
- Пальчиков С. Б., Липаткин В. А., Румянцев Д. Е., Гиряев Н. М. Экспертиза места происхождения древесины как ведущий фактор контроля за оборотом круглых лесоматериалов // Ежегодные Реймеровские чтения. Науч. тр. МНЭПУ. М: МНЭПУ, 2012. Т. 2012. С. 98–108 [Pal'chikov S. B., Lipatkin V. A., Rumyantsev D. E., Giryayev N. M. Ekspertiza mesta proiskhozhdeniya drevesiny kak vedushchiy faktor kontorolya za oborotom kruglykh lesomaterialov (Examination of origin of wood as a leading factor in control for trade of round timber) // Yezhegodnye Reimerovskie chteniya. Nauch. tr. MNEPU (Annual Reimers Readings. Sci. works of MNEPU). Moscow: MNEPU, 2012. V. 2012. P. 98–108 (in Russian with English abstract)].
- Пелявина И. П. «Мы заинтересованы, чтобы лес перерабатывался именно на территории Пермского края» (интервью министра природных ресурсов Пермского края Дмитрия Килейко) // Коммерсантъ. Темат. приложение «Лесн. пром-сть». 17.09.2019 г. № 168. С. 10 [Pelyavina I. P. «My zainteresovany, chtoby les pererabatyvalysya imenno na territorii Permskogo kraya» (interviewu ministra prirodnnykh resursov Permskogo kraya Dmitriya Kileyko) («We are interested in forest processing on the territory of the Perm Krai» (interview with Dmitry Kileyko, Minister of Natural Resources of the Perm Krai)) // Kommersant. Temat. prilozhenie «Lesn. prom-st'» (Kommersant, thematic application «Forest industry»). 17.09.2019. N. 168. P. 10 (in Russian)]. <https://www.kommersant.ru/doc/4095721>
- Пришневская Я. В., Красильников В. П., Боронникова С. В. Молекулярно-генетическая идентификация популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке Русской равнины на основании полиморфизма ISSR-маркеров // Вестн. Перм. ун-та. Сер. Биол. 2016. № 2. С. 171–176 [Prishnevskaya Ya. V., Krasil'nikov V. P., Boronnikova S. V. Molekulyarno-geneticheskaya identifikatsiya populyatsiy *Pinus sylvestris* L. na vostoке Russkoy ravniny na osnovanii polimorfizma ISSR-markero (Molecular genetic identification of populations of *Pinus sylvestris* L. in the east of the Russian plain based on polymorphism of ISSR-markers) // Vestn. Perm. un-ta. Ser. Biol. (Bull. Perm Univ. Ser. Biol.). 2016. N. 2. P. 171–176 (in Russian with English abstract)].
- Пришневская Я. В., Нассонова Е. С., Чертов Н. В., Жуланов А. А., Васильева Ю. С., Боронникова С. В., Календарь Р. Н. Внутривидовое генетическое разнообразие популяций двух видов древесных растений Пермского края // Бюл. науки и практики. 2019. Т. 5. № 4. С. 58–68 [Prishnevskaya Ya. V., Nassonova E. S., Chertov N. V., Zhulanov A. A., Vasil'eva Yu. S., Boronnikova S. V., Kalendar R. N. Vnutrividovoe geneticheskoe raznoobrazie populyatsiy dvukh vidov drevesnykh rasteniy Permskogo kraya (Genetic diversity within species of two species woody plants populations in Perm Krai) // Byul. nauki i praktiki (Bull. Sci. and Practice). 2019. V. 5. N. 4. P. 58–68 (in Russian with English abstract)].
- Чимидов Ц. Счетная палата оценила ущерб от незаконных вырубок леса в 12 млрд рублей в год // Общественное телевидение России. 03.12.2019 [Chimidov Ts. Schetnaya palata otsenila ushcherb ot nezakonnnykh vyrubok lesa v 12 mlrd rubley v god (The accounting chamber estimated the damage from illegal logging at 12 billion rubles a year) // Obshchestvennoe teledivlenie Rossii (Public television of Russia). 03.12.2019 (in Russian)]. https://otr-online.ru/news/schetnaya-palata-ocenila-ushcherb-ot-nezakonnnyh-vyrubok-lesa-v-12-mlrd-rubley-v-god-140853.html?fbclid=IwAR2J9-I-CFsVJTkDjYU8-HcTGDfBIwBr-MKT9Jv_rBaTq61_QwctEH2oyRA
- Шилкина Е. А., Ибе А. А., Шеллер М. А., Сухих Т. В. Использование методов ДНК-анализа в экспертизе незаконного оборота древесины // Сиб. лесн. журн. 2019. № 3. С. 64–70 [Shilkina E. A., Ibe A. A., Sheller M. A., Sukhikh T. V. Ispol'zovanie metodov DNK-analiza v ekspertize nezakonnogo oborota drevesiny (Using methods of DNA-analysis in the examination of the illegal timber trade) // Sib. lesn. zhurn. (Sib. J. For. Sci.). 2019. N. 3. P. 64–70 (in Russian with English abstract)].
- Cota-Sanchez J. H., Remarchyk K., Ubayasena K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue // Plant Mol. Biol. Rep. 2006. V. 24. N. 2. P. 161–167.
- Degen B., Höltken A. M., Rogge M. Use of DNA-fingerprints to control the origin of forest reproductive material // Silvae Genet. 2010. V. 59. N. 6. P. 268–273.
- Groudeva V. Remediation of metal pollutants by sulfate-reducing bacteria // Environment protection and biotechnology – innovative aspects / Editor-in-chief A. Kujumdzhieva. Sofia: National bank for industrial microorganisms and cell cultures, 2001. BioINEP published series. P. 7–33.

- Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. N. 19. P. 2537–2539.
- Vlam M., Groot G. A. de, Boom A., Copini P., Laros I., Veldhuijzen K., Zakamdi D., Zuidema P. A. Developing forensic tools for an African timber: Regional origin is revealed by genetic characteristics, but not by isotopic signature // *Biol. Conserv.* 2018. V. 220. P. 262–271.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. J., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. 1994. V. 20. N. 2. P. 176–183.
- Vlam M., Groot G. A. de, Boom A., Copini P., Laros I., Veldhuijzen K., Zakamdi D., Zuidema P. A. Developing forensic tools for an African timber: Regional origin is revealed

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF SCOTS PINE AND SIBERIAN LARCH POPULATIONS IN PERM KRAI BASED ON POLYMORPHISM OF ISSR-PCR MARKERS

Ya. V. Sboeva¹, Yu. S. Vasil'eva¹, N. V. Chertov¹, N. A. Pystogova¹, S. V. Boronnikova¹, R. N. Kalendar², N. A. Martynenko^{1,3}

¹ Perm State National Research University
Bukirev str., 15, Perm, 614990 Russian Federation

² National Center for Biotechnology
Kurgal'zhynskoe shosse, 13/5, Nur-Sultan, 010000 Republic of Kazakhstan

³ Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences
Botanicheskaya str., 35, Moscow, 127276 Russian Federation

E-mail: yana_prishnivskaya@mail.ru, yulianechaeva@mail.ru, syper.gall@mail.ru, n.pystogova9@gmail.com, svboronnikova@yandex.ru, ruslan.kalendar@mail.ru, nikita-martynenko@yandex.ru

The use of DNA-fingerprinting of forest-forming woody plants is considered the most promising tool for genetic control of wood's geographic origin, the formation of a reliable management system for harvesting and turnover of lumber. The purpose of this work was to search for identification markers, genotyping trees, and molecular genetic identification of previously not studied 2 populations of the Siberian larch *Larix sibirica* Ledeb. and 4 populations of Scots pine *Pinus sylvestris* L. of different regions of the Perm Krai. To DNA extraction, from each plant specimens wood were individually obtained and a modified method of extracting DNA from wood was used. In total, the analysis used the DNA of 114 Scots pine trees and 55 Siberian larch trees. For genetic testing, we used ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)-method of DNA polymorphism analysis. Genetic identification was performed based on the original author's method proposed by S. V. Boronnikova and I. V. Boboshina (2014). As a result of molecular genetic analysis, 74 ISSR markers were found and analyzed in populations of Scots pine, 85 ISSR markers were identified in populations of the Siberian larch, and the share of polymorphic loci in both species was high. As a result of molecular genetic identification, identification of species and polymorphic ISSR-markers and their combinations were found that characterize the belonging of trees to a species, as well as to a specific population. Molecular genetic formulas and barcodes for each individual population of two species have been compiled. The effectiveness, stability, and reproducibility of detected identification markers and their combinations have been proven through anonymous testing. The data obtained are the basis for determining the place of origin of wood, which will allow us to recommend measures to counter illegal logging and reduce the damage to the budget of logging regions of Russia, such as the Perm Krai.

Keywords: DNA polymorphism, genetic diversity, ISSR-analysis, *Larix sibirica* Ledeb., *Pinus sylvestris* L., genetic formulas, barcodes.

How to cite: Sboeva Ya. V., Vasil'eva Yu. S., Chertov N. V., Pystogova N. A., Boronnikova S. V., Kalendar R. N., Martynenko N. A. Molecular genetic identification of Scots pine and Siberian larch populations in Perm Krai based on polymorphism of ISSR-PCR markers // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2020. N. 4. P. 35–44 (in Russian with English abstract and references).