

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОМ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИИ  
ДВУХ РЕДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВИДОВ РОДА *ADONIS*  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МАРКЕРОВ

С.В. БОРОННИКОВА, Н.Н. ТИХОМИРОВА

(Кафедра ботаники и генетики растений  
Пермского государственного университета)

Проведено изучение генетического полиморфизма ДНК двух редких ресурсных видов растений с использованием ISSR-маркеров. Рассчитаны показатели, характеризующие уровень полиморфизма и генетического разнообразия. Получены данные о выраженных межвидовых отличиях по сочетанию длин амплифицированных фрагментов ДНК двух видов рода *Adonis*. Для популяционно-генетического мониторинга генофондов лесных редких видов растений предложен способ определения уровня генетического разнообразия.

Одним из важнейших достижений науки и практики минувшего века явилось то, что леса планеты стали рассматриваться в общественном сознании как один из глобальных факторов обеспечения устойчивого развития человечества и экологической безопасности его жизнедеятельности. Доказано, что леса — наиболее емкий резервуар генетического разнообразия организмов [12].

Для разработки стратегии сохранения и рационального использования лесных ресурсов, обеспечивающих удовлетворение экономических потребностей общества и охрану биоразнообразия природных сообществ, необходимы глубокие знания о состоянии их генофондов, оцениваемых уровнями внутри- и межпопуляционного генного разнообразия. Для мониторинга генофондов ресурсных видов растений в соответствии с современным уровнем развития науки требуются количественные оценки популяционно-генетических параметров с помощью молекулярно-генетических маркеров.

Особое место среди ресурсных видов растений занимают травянистые лекарственные виды, большая часть которых из-за антропогенного воздействия является редкими. При использовании лекарственных видов растений важна идентификация растительного сырья, так как близкие виды растений, используемые в качестве лекарственных, могут обладать различным фармацевтическим потенциалом.

Цель нашей работы — провести анализ генетической изменчивости двух редких лекарственных видов растений на популяционном уровне. На основе полученных в ходе выполнения данной работы и при обобщении ранее полученных результатов установить принцип определения уровня генетического разнообразия как основы популяционно-генетического мониторинга генофондов лесных ресурсных видов растений с использованием молекулярно-генетических маркеров, пригодных для молекулярно-генетической идентификации и паспортизации лесных ресурсных видов растений.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 07-04-96032.

## Материалы и методы

В качестве объектов исследований были избраны редкие лекарственные и декоративные виды растений Пермского края из семейства *Ranunculaceae* Juss.: *Adonis vernalis* L. и *Adonis sibirica* Patr. ex Ledeb. с категорией угрожаемого состояния 3 (R) — редкие виды [5, 9]. Сбор материала проведен в 2003-2007 гг.; молекулярно-генетический анализ — в 2006-2007 гг. Исследования проводили на уровне ценопопуляций, т. е. конкретных популяций, расположенных в пределах данного фиточеноза. Исследованы три ценопопуляции *A. vernalis*: первая (Av1) расположена в Октябрьском районе в 2,5 км к северо-западу от с. Богородск на суходольном лугу около оз. Карасье, вторая (Av2) — в 2,5 км к востоку от д. Иштеряки Октябрьского района, на правом берегу р. Сухой Телес, третья (Av3) — в березовом редколесье в Кунгурском районе на Спасской горе в 4 км от с. Плеханово. Изучение ценопопуляций *A. sibirica* проводили на территории Добрянского и Кишертского районов. Первая ценопопуляция *A. sibirica* (As1) расположена в травянистом ельнике около п. Полазна, вторая — в мелколиственном лесу на территории УНБ «Предуралье» (As2).

Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма ДНК двух видов рода *Adonis* были собраны листья с 30 случайно выбранных растений, в каждой ценопопуляции на расстоянии от 30 до 50 м друг от друга. В дальнейшем выборку уменьшили до 24 особей.

Для выделения ДНК использовали методику [20] с незначительными модификациями. При выделении ДНК из проростков брали навески по 50, а из свежесобранных листьев — по 100 мг. Выявление генетического полиморфизма ДНК проводили ISSR- (Inter Simple Sequence Repeats) методом [21]. Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции объемом 25 мкл содер-

жала: 2 единицы Taq-полимеразы («Силекс М»), 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР (Силекс М), 25 пМ праймера, 2,5 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0,25 мМ dNTP. На смесь наслаивали 2 капли минерального масла. Амплификацию ДНК двух видов адонисов весеннего проводили с использованием 5 ISSR-праймеров, синтезированных в ЗАО «Синтол» и «Евроген» (Москва).

Амплификацию проводили в термодинамическом цикле «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Москва) для ISSR-анализа по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин; первые пять циклов 94°C, 20 с; t° отжига, 10 с; 72°C, 10 с; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 с; t отжига, 5 с; 72°C, 5 с. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 46 до 56°C [3]. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 2%-м агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp +1.5 + 3 Кб DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Москва),<sup>1</sup> определение длин фрагментов проводили с использованием программы Photoshop 8.0.

Для проведения молекулярно-генетического анализа была выделена ДНК из 120 образцов листьев и проростков. Фрагменты листьев и семена для проращивания были собраны в пяти ценопопуляциях двух редких ресурсных видов растений. Анализ полиморфизма ДНК проведен у 624 проб ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ISSR-метода.

Для количественной оценки степени полиморфизма и определения уров-

ня дивергенции между изученными ценопопуляциями полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в ISSR-спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось соответственно как состояние 1 или 0. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты, полиморфизм по интенсивности не брали в расчет.

Проведен компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК с помощью компьютерной программы PopGen32 и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel [2,11] с определением: доли полиморфных локусов (при  $p_{0,95}$ ) [13], общего числа аллелей ( $n_3$ ), эффективного числа аллелей ( $n_e$ ) [16], ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) [18]. Для оценки генетического разнообразия внутри и между популяциями была выбрана информационная мера Шеннона [14], традиционно применяемая для оценки генетического разнообразия редких видов растений на популяционном уровне [1]. Индекс разнообразия Шеннона рассчитывали для каждой ценопопуляции ( $H_0$ ), среднее значение — для популяций ( $H_{pop}$ ) и для

суммарной выборки ( $H_{sp}$ ), на основе этих значений определяли долю внутри- и межпопуляционного разнообразия.

В качестве показателей оценки генного разнообразия мы использовали следующие параметры: общее генное разнообразие в суммарной выборке ( $H_s$ ), среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам ( $H_s$ ) и показатель подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) [17, 18]. Генетическое расстояние между ценопопуляциями определяли по формуле М. Nei [17, 19].

Статистическая обработка данных проведена по методикам [7, 10].

### Результаты и их обсуждение

У двух редких лекарственных видов (*A. vernalis* и *A. sibirica*) изучено генетическое разнообразие в пяти ценопопуляциях. Выявление полиморфизма длин амплификационных фрагментов ДНК, получаемых в результате ПЦР, проведено с использованием полиморфизма межмикросателлитной ДНК (ISSR-метод). В трех изученных ценопопуляциях *A. vernalis* выявлено 72 амплифицированных фрагмента ДНК, 67 из которых были полиморфными (табл. 1). Число амплифицированных фрагментов ДНК в суммарной

Таблица 1

Характеристика фрагментов ДНК двух видов рода *Adonis*

ISSR-праймер	Нуклеотидная последовательность (5'↯3')	Размеры фрагментов, пн	Число полиморфных фрагментов в популяциях (их частота)			Число фрагментов	
			Av1	Av2	Av3	учитываемых	полиморфных
<i>Adonis vernalis</i>							
M1	(AC) <sub>8</sub> CG	400–1900	12 (0,8571)	13 (0,9286)	9 (0,6429)	14	13 (0,9286)
M2	(AC) <sub>8</sub> CC	360–1650	8 (0,7273)	8 (0,7273)	7 (0,6364)	11	9 (0,8182)
M3	(AC) <sub>8</sub> CT	400–1700	9 (0,6923)	10 (0,7692)	9 (0,6923)	13	12 (0,9231)
M9	(GAC) <sub>4</sub>	320–1550	14 (1,0000)	13 (0,9286)	10 (0,7143)	14	14 (1,0000)
M12	(CA) <sub>6</sub> G	400–1750	14 (0,7000)	16 (0,8000)	14 (0,7000)	20	19 (0,9500)
Всего			57 (0,7916)	60 (0,8333)	49 (0,6806)	72	67 (0,9306)
<i>Adonis sibirica</i>							
			As1	As2			
M1	(AC) <sub>8</sub> CG	320–1550	4 (0,4000)	6 (0,6000)		10	6 (0,6000)
M12	(CA) <sub>6</sub> G	450–1750	7 (0,4118)	9 (0,5294)		17	14 (0,8235)
Всего			11 (0,4059)	15 (0,5647)		27	21 (0,7117)

выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 7 (M2) до 16 (M12). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 14 фрагментов ДНК (рис. 1). Число полиморфных фрагментов в суммарной выборке растений *A. vernalis* варьировало от 9 до 19, а их размеры — от 320 до 1900 пн. Уровень полиморфизма в суммарной выборке в зависимости от ISSR-праймера колебался от 81,82 до 100% и в среднем составил 93,06%.

Уровень полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК *A. ver-*

*nalis*, полученных в результате ПЦР со всеми ISSR-праймерами, в Av1 составил 79,16%, в Av2 — 83,33% и в Av3 — 68,06%. Праймер M3 выявил самые низкие значения полиморфизма в популяциях, а праймер M9 — самые высокие. Уровень полиморфизма в суммарной выборке в зависимости от ISSR-праймера колебался от 81,82 до 100% и в среднем составил 93,06% (см. табл. 1).

В двух изученных ценопопуляциях *A. sibirica* ISSR-праймеры инициировали синтез 27 фрагментов ДНК, 21

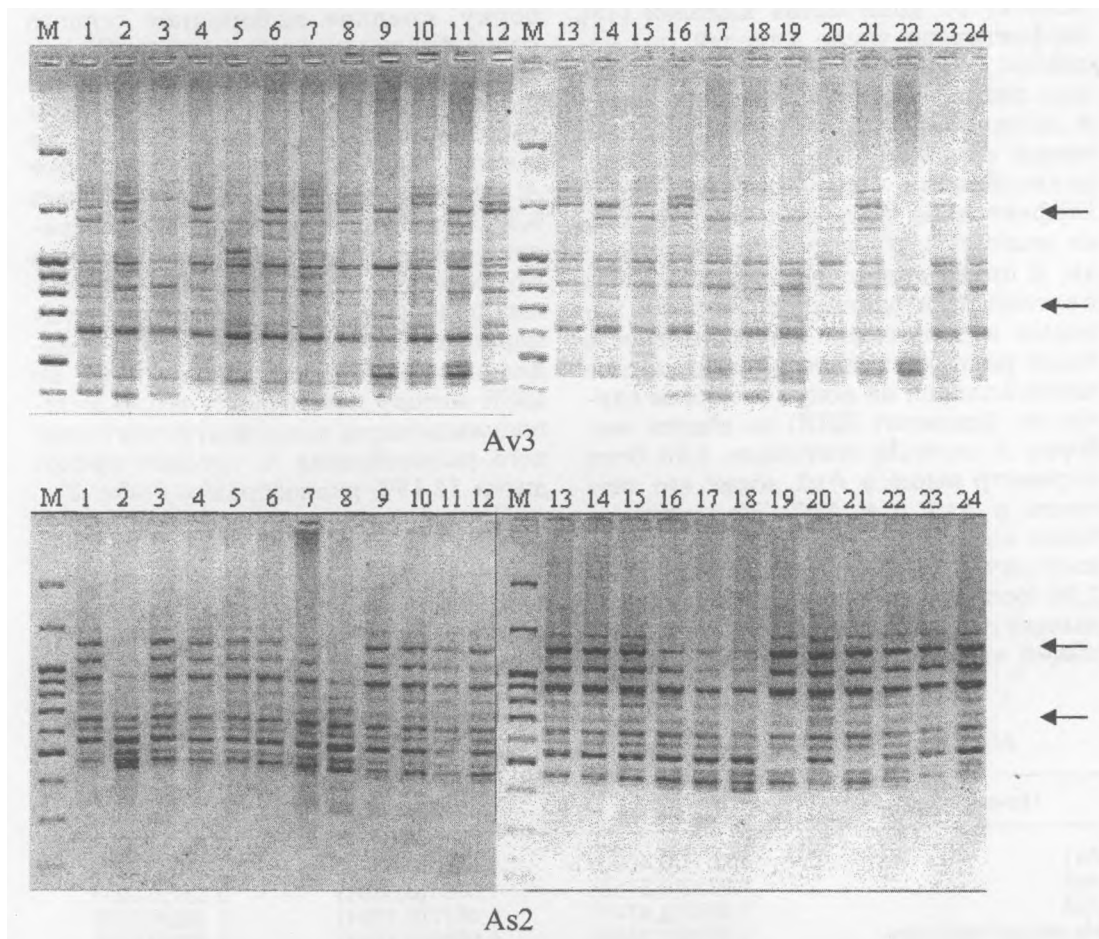


Рис. 1. ISSR-спектр ценопопуляции *A. vernalis* (Av3), *A. sibirica* (As2) с праймером M12: цифрами обозначены номера проб, M — молекулярный маркер, с фрагментами размером сверху вниз 2000 пн, 1500 пн., 1000 пн, 900 пн, 800 пн и т.д.; стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты ДНК

из которых были полиморфными, доля полиморфных локусов составила 71,17% (см. табл. 1). Размеры фрагментов варьировали от 230 до 1750 пн. Доля полиморфных локусов в первой ценопопуляции *A. vemalis* (As1) составила 40,59, во второй ценопопуляции (As2) — 56,47%.

Самой распространенной мерой генетической изменчивости в популяции является гетерозиготность. Теоретически гетерозиготность распределяется в популяции сложным образом, а величины гетерозиготности не слишком зависят от количества аллелей [13]. Эффективное число аллелей ( $n_e$ ) является функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на локус и выравнивания частот аллелей и, таким образом, мерой генетического разнообразия популяции или вида. Эффективное число аллелей оценивает величину, обратную гомозиготности, и представляет собой такое число аллелей, при одинаковой частоте которых в популяции гетерозиготность будет равна фактической. Абсолютное число аллелей на локус (в нашем случае на фрагмент ДНК) на общую выборку *A. vemalis* составило 1,93. Этот параметр выше в Av2, ниже его значение в Av1 и в Av3. Эффективное число аллелей на локус ( $n_e$ ) на общую выборку по ISSR-праймам равно 1,56. Больше значение  $n_e$  в Av2. Ожидаемая гетерозиготность по локусам в общей выборке *A. vemalis* по ISSR-

праймам составила 0,332, в Av1 — 0,276, в Av2 — 0,337 и в Av3 — 0,260 (табл. 2). У *A. sibirica* абсолютное число аллелей на локус ниже и составило 1,74, а эффективное число аллелей на локус отличается незначительно — 1,51 (см. табл. 2). Ожидаемая гетерозиготность на общую выборку *A. sibirica* также ниже и равна 0,286.

М. Ней [18] назвал величину гетерозиготности генным разнообразием и на ее основе ввел понятия: общее генного разнообразия в суммарной выборке ( $H_T$ ) — гетерозиготность на всю выборку, среднее выборочное генного разнообразия по всем локусам ( $H_S$ ) — средняя гетерозиготность по популяциям и показатель подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ). Показатель общего генного разнообразия на всю выборку *A. vemalis* по ISSR-методу составил 0,3317, а среднего генного разнообразия — 0,2913. Таким образом, средняя гетерозиготность *A. vemalis* в изученных ценопопуляциях ниже, чем в суммарной выборке. Коэффициент подразделенности ценопопуляций ( $G_{ST}$ ) по ISSR-методу показывает, что на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия *A. vemalis* приходится 12,19% разнообразия (табл. 3).

Среднее значение гетерозиготности ( $H_S$ ) в изученных ценопопуляциях *A. sibirica* ниже, чем у *A. vemalis* и составило 0,1736 (см. табл. 3). Показатель генетической подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) *A. sibirica* трижды пре-

Т а б л и ц а 2

Абсолютное и эффективное число аллелей, ожидаемая гетерозиготность

Ценопопуляция	$n_a$	$n_e$	$H_e$
Av1	1,7917(0,4090)	1,4916(0,3382)	0,276(0,021)
Av2	1,8333(0,3753)	1,6061(0,3651)	0,337(0,021)
Av3	1,6667(0,4747)	1,4677(0,4091)	0,260(0,025)
На общую выборку	1,9306(0,2560)	1,5658(0,3194)	0,332(0,023)
As1	1,4074(0,5007)	1,2403(0,3390)	0,130(0,037)
As2	1,5556(0,5064)	1,3485(0,3792)	0,204(0,039)
На общую выборку	1,7407(0,4466)	1,5097(0,4037)	0,286(0,041)

П р и м е ч а н и е.  $n_a$  — абсолютное число аллелей на локус;  $n_e$  — эффективное число аллелей на локус;  $H_e$  — ожидаемая гетерозиготность; в скобках даны стандартные отклонения.

Таблица 3

## Параметры генного разнообразия [18]

ISSR-праймер	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
<i>Adonis vernalis</i>			
M1	0,3623(0,0217)	0,3052(0,0164)	0,1575
M2	0,2774(0,0404)	0,2567(0,0369)	0,0746
M3	0,3265(0,0207)	0,2823(0,0195)	0,1352
M9	0,3303(0,0165)	0,2952(0,0154)	0,1063
M12	0,3452(0,0208)	0,3040(0,0192)	0,1192
На общую выборку	0,3317(0,0225)	0,2913(0,0198)	0,1219
<i>Adonis sibirica</i>			
M1	0,2433(0,0529)	0,1901(0,0447)	0,2185
M12	0,3116(0,0348)	0,1639(0,0231)	0,4739
На общую выборку	0,2863(0,0409)	0,1736(0,0299)	0,3935

Примечание.  $H_T$  — общее генное разнообразие в суммарной выборке;  $H_S$  — среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам;  $G_{ST}$  — показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения.

вышает аналогичный показатель ( $G_{ST}$ ) *A. vernalis* (см. табл. 3). На межпопуляционную изменчивость у данного вида приходится 39,35%.

Оценка внутри- и межпопуляционного разнообразия была проведена также на основе информационного индекса Шеннона [14], традиционно применяемого для оценки генетического разнообразия редких видов растений [1]. Среднее значение индексов разно-

образия Шеннона в изученных ценопопуляциях *A. vernalis*, рассчитанное по ISSR-праймерам, составило 42,52% (табл. 4). Выше этот показатель в *Av2*. Индекс Шеннона, рассчитанный на общую выборку *A. vernalis*, равен 49,13%. На долю внутривидового генетического разнообразия *A. vernalis* приходится 86,71, а на долю межпопуляционного — 13,28%. Среднее значение индексов разнообразия Шен-

Таблица 4

## Генное разнообразие внутри и между ценопопуляциями (по индексу Шеннона)

Праймер ISSR	$H_0$			$H_{sp}$	$H_{pop}$	$H_{pop} / H_{sp}$	$(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$
	<i>Av1</i>	<i>Av2</i>	<i>Av3</i>				
<i>Adonis vernalis</i>							
M1	0,4628	0,5263	0,3583	0,5323	0,4491	0,8437	0,1562
M2	0,4055	0,4152	0,3132	0,4148	0,3779	0,9112	0,0887
M3	0,3540	0,4561	0,4313	0,4917	0,4138	0,8415	0,1584
M9	0,4341	0,5622	0,3321	0,5034	0,4428	0,8796	0,1203
M12	0,4147	0,4797	0,4325	0,5145	0,4423	0,8596	0,1403
Среднее для вида	0,4142	0,4879	0,3734	0,4913	0,4252	0,8671	0,1328
<i>Adonis sibirica</i>							
	<i>As1</i>	<i>As2</i>					
M1	0,2433	0,316		0,3532	0,2796	0,7917	0,2082
M12	0,1980	0,2952		0,4599	0,2466	0,5362	0,4637
Среднее для вида	0,2206	0,3056		0,4065	0,2631	0,6639	0,3360

Примечание.  $H_0$  — индекс разнообразия Шеннона для ценопопуляции;  $H_{sp}$  — индекс разнообразия Шеннона для суммарной выборки;  $H_{pop}$  — среднее значение индекса разнообразия Шеннона для ценопопуляций;  $H_{pop} / H_{sp}$  — внутривидовое разнообразие;  $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$  — межпопуляционное разнообразие.

нона в изученных ценопопуляциях *A.sibirica*, рассчитанное по ISSR-праймам, составило 26,31%. Индекс разнообразия для суммарной выборки ( $H_{sp}$ ) значительно выше, чем индекс разнообразия каждой отдельной ценопопуляции ( $H_0$ ) (см. табл. 4). Доля межпопуляционного разнообразия *A.sibirica* составила 33,60%.

Таким образом, оба подхода к определению генетического разнообразия, т. е. определение показателя подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ) и коэффициента Шеннона, дали близкие результаты у изученных видов. При изучении лесных ресурсных видов растений можно рекомендовать оба подхода, но, на наш взгляд, метод определения показателя подразделенности популяций ( $G_{ST}$ ), предложенный [18], более приемлем для видов, имеющих большую численность популяций, а определение индекса Шеннона — для редких видов растений с минимальной численностью популяций.

Наименьшее генетическое расстояние между исследуемыми ценопопуляциями а *A. vernalis*, рассчитанное по [17], отмечено между у Av1 и Av2 (0,0624). Ценопопуляции Av2 и Av3 характеризуются средним генетическим расстоянием — 0,3009. Наиболее генетически удаленными являются ценопопуляции Av1 и Av3 (0,1111), что соответствует географическим расстояниям между ними. Генетическое расстояние между исследуемыми ценопопуляциями *A.sibirica* (As1 и As2) составило 0,3178, что также находится в соответствии с географическим расстоянием между этими ценопопуляциями.

Таким образом, самые низкие показатели генетического разнообразия отмечены в первой ценопопуляции *A.sibirica* (As1), расположенной на Луневских горах Добрянского района Пермского края ( $P = 40,59\%$ ;  $H_0 = 0,22$ ;  $H_e = 0,13$ ). Среди изученных ценопопуляций *A. vernalis* ниже уровень генетического разнообразия в третьей

ценопопуляции (Av3), расположенной на Спасской горе Кунгурского района ( $P = 68,06\%$ ;  $H_0 = 0,37$ ;  $H_e = 0,26$ ). Именно эти ценопопуляции характеризуются резко сокращающейся и минимальной общей численностью.

При проведении молекулярно-генетического анализа ценопопуляций *A. vernalis* и *A.sibirica* с помощью ISSR-метода нами были выявлены уникальные фрагменты ДНК, отмечены четкие мономорфные и полиморфные фрагменты ДНК, присутствующие в спектрах электрофореза ценопопуляций и суммарных выборок. Предлагаем на основе результатов, полученных при анализе генетического разнообразия ценопопуляций двух видов рода *Adonis*, проведение генетической паспортизации лекарственных видов растений с применением ISSR-метода, как более информативного и дающего воспроизводимые результаты. Данный молекулярно-генетический метод позволит в общей массе растительного сырья идентифицировать *A. vernalis*, обладающий значительно большим фармацевтическим потенциалом для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, нежели *A.sibirica*.

#### Заключение

Предлагаемый подход определения уровня генетического разнообразия, как основы популяционно-генетического мониторинга генофондов редких и ресурсных видов растений, был нами сформулирован и проверен при изучении шести ресурсных редких видов растений Пермского края, имеющих декоративное и лекарственное значение. Среди изученных ценопопуляций двух видов рода *Adonis* самые низкие показатели генетического разнообразия нами отмечены в первой ценопопуляции *A.sibirica* (As1), расположенной на Луневских горах Добрянского района Пермского края ( $P = 40,59\%$ ;  $H_0 = 0,22$ ;  $H_e = 0,13$ ). У *A. vernalis* ниже уровень генетического разнообразия в третьей ценопопуляции (Av3), расположенной на Спасской горе Кунгурского района ( $P = 68,06\%$ ;  $H_0 =$

= 0,37;  $H_e = 0,26$ ). Именно эти ценопопуляции характеризуются резко сокращающейся или минимальной общей численностью.

Для популяционно-генетического мониторинга генофондов редких ресурсных видов растений рекомендуется проводить количественные оценки популяционно-генетических параметров, полученных с помощью молекулярно-генетических маркеров. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК на популяционном уровне следует проводить с помощью разных поколений молекулярно-генетических маркеров, таких как ISSR- и GOAP-маркеры [21, 15, 8, 6, 4, 3]. Уровень генетического разнообразия рекомендуем определять на основе следующих показателей [2]: процента полиморфных локусов ( $P$ ), ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ), индекса разнообразия Шеннона и доли внутри- и межпопуляционного разнообразия [17, 18, 19, 14]. Компьютерный анализ генетической изменчивости ДНК в различных популяциях в связи с массовым характером оценки параметров следует проводить с помощью компьютерной программы PopGen32 и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel [2], с определением: доли полиморфных локусов (при  $Ro_{эб}$ ) [13], общего числа аллелей ( $n_a$ ), эффективного числа аллелей ( $n_e$ ) [16], ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) [18]. Для оценки генетического разнообразия внутри и между популяциями редких видов растений рекомендуется информационная мера Шеннона [14, 1]. Индекс разнообразия Шеннона рекомендуется рассчитывать для каждой ценопопуляции ( $H_0$ ), среднее значение — для популяций ( $H_{pop}$ ) и для суммарной выборки ( $H_{sp}$ ), на основе этих значений определять долю внутри- и межпопуляционного разнообразия.

В качестве показателей оценки генного разнообразия популяций рекомендуется использовать следующие параметры: общее генное разнообразие в суммарной выборке ( $H_T$ ), среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам ( $H_s$ ) и показатель подразделенности популяций ( $G_{st}$ ) [17, 18]. Генети-

ческое расстояние между популяциями рекомендуется определять по формулам М. Nei [17, 19].

В связи с большей емкостью генетического разнообразия в лесных экосистемах рекомендуется разработку и апробацию стратегии сохранения и рационального использования растительных ресурсов проводить на примере как травянистых, так и древесных лесных ресурсных видов растений.

Таким образом, разработанный нами на примере редких ресурсных видов растений Пермского края новый подход определения уровня генетического разнообразия является методологической основой популяционно-генетического мониторинга генофондов редких и ресурсных видов растений, позволяющей определить закономерности динамики генофондов в норме и при антропогенных воздействиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (*Fabaceae*) на основе RAPD-маркеров // Генетика, 2004. Т. 40. № 7. С. 877-884. — 2. Боронникова С.В. Популяционно-генетический мониторинг генофондов редких ресурсных видов растений Пермского края // Флора Урала в пределах бывшей Пермской губернии и ее охрана. Пермь, 2007. — 3. Боронникова С.В., Кокаева З.Г., Дрибнохофова О.П. и др. Анализ ДНК-полиморфизма реликтового вида Урала наперстянки крупноцветковой (*Digitalis grandiflora grandiflora* Mill.) с помощью RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика, 2007. Т. 43. № 5. С. 1-7. — 4. Глазко Т.Т., Глазко В.И. Молекулярно-генетические подходы в селекции зерновых // Изв. ТСХА, 2006. № 4. С. 100-107. — 5. Горчаковский П.Л., Шурова Е.А. Редкие и исчезающие растения Урала и Предуралья. М.: Наука, 1982. — 6. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика, 2005. Т. 41. № 4. С. 1-15. — 7. Животовский Л.А.



Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Общая генетика. М.: ВИНТИ АН СССР, 1983. Т. 8. С. 76-104. — 8. *Календарь Р.Н., Глазко В.И.* Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений, 2002. Т. 34. №. 4. С. 141-156. — 9. Красная книга Среднего Урала (Свердловская и Пермская области): Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. Екатеринбург: Изд-во Урал, ун-та, 1996. — 10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. — 11. Молекулярная генетика: учеб.-метод. пособие / Под. ред. С.В. Боронниковой; Перм. ун-т. Пермь, 2007. — 12. *Писаренко А.И.* Лесовосстановление и лесоразведение — основа решения глобальных проблем изменения климата // Лесное хозяйство России:

начало третьего тысячелетия. М.: ВНИИЛМ, 2003. С. 31-47. — 13. *Хедрик Ф.* Мир биологии: генетика популяций / Ф. Хедрик / Пер. с англ. А.А. Лушниковой, Н.В. Петровой. М.: Техносфера, 2003. — 14. *Chalmers K.J., Waugh R., Sprent J.I. et al.* // *Heredity*, 1992. V. 69. P. 465-472. — 15. *Kalendar R., Grob T., Regina M. et al.* // *Theor. Appl. Genet.* 1999. V. 98. P. 704-711. — 16. *Kimura M.* The number of alleles that can be maintained in a finite population / Kimura M., Crow J.F // *Genetics (US)*, 1964. Vol. 49. P. 725-738. — 17. *Nei M.* // *Amtr. Natur.* 1972. Vol. 106. P. 283-292. — 18. *Nei M.* // *Columbia Univ. press*, 1987. P. 176—187. — 19. *Nei M., Li W.-H.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979. V. 76. P. 5269-5273. — 20. *Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. II* *Theor. Appl. Genet*, 1993. V. 5. P. 937-945. — 21. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* // *Genomics*. 1994. V. 20. P. 176-183.

*Рецензент* — д. с.-х. н., проф. В.И. Глазко

#### SUMMARY

Genetic polymorphism DNA of 2 rare forest plant species was examined using ISSR techniques. Parameters of polymorphism and genetic diversity were determined. The data on expressed differentiation between species on combination of amplification products with different length of DNA fragments of 2 species *Adonis* were obtained. The principle of determining level of genetic diversity to monitoring of genetics of forest rare species has been offered.