

УДК 575.174.015.3: 582.623.2

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ПОПУЛЯЦИЙ ТОПОЛЯ ЧЕРНОГО НА СРЕДНЕМ И ЮЖНОМ УРАЛЕ

© 2015 Н.А. Мартыненко¹, А.Р. Ахметов², С.В. Боронникова¹, Ю.С. Нечаева¹,
Я.В. Пришнивская¹, Н.А. Никоношина¹

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет

² Башкирский государственный аграрный университет, г. Уфа

Поступила в редакцию 22.05.2015

Проанализированы основные методы определения генетической дифференциации популяций древесных видов растений на основании полиморфизма молекулярных маркеров, таких как SSR (Simple Sequence Repeat)-PCR маркеры. С использованием четырех методов установлено генетическое расстояние между четырьмя изученными популяциями *Populus nigra* L. на Урале. Наибольшее генетическое расстояние ($D=1,086$), определенное по методам Дж. Рейнольдса, Б. Вейра и С. Кокерхэма, отмечено между популяцией *P. nigra* около г. Стерлитамак Республики Башкортостан и популяцией ООПТ «Спасская гора» Пермского края. Наименьшее генетическое расстояние ($D=0,036$), определенное по методу Л. Кавалли-Сфорца и А. Эдвардса, установлено между популяциями около г. Стерлитамак и около г. Инзер Республики Башкортостан. При сравнении методов кластеризации, таких как метод невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA), метод ближайшего соседа (Neighbor Joining Method) и метод взвешенных наименьших квадратов по критерию Фитч-Марголиаша, выявлено, что для определения генетической дифференциации изученных популяций *P. nigra* с использованием полиморфизма кодоминантных маркеров, наиболее оптимален метод Л. Кавалли-Сфорца и А. Эдвардса. При кластеризации в программе STRUCTURE 2.3.4 изученные популяции *P. nigra* разделились на 2 кластера: популяции из Республики Башкортостан и популяции из Пермского края. Установлена высокая корреляция между генетической дифференциацией и географическим расстоянием изученных четырех популяций *P. nigra* на основании теста Мантела. Показана высокая корреляция между генетическим и географическим расстоянием у изученных популяций *P. nigra*, так как высок коэффициент детерминации (R^2) показателя генетической дифференциации (0,694 по методу С. Райта, 0,787 по методу М. Нея).

Ключевые слова: *Populus nigra* L., популяция, микросателлит, кластеризация, генетическое расстояние, генетическое разнообразие

Для решения проблемы сохранения и возобновления лесных ресурсов необходима комплексная оценка их состояния в зависимости от сохранности естественных мест произрастания и интенсивности использования в связи с тем, что объемы и формы эксплуатации биоресурсов с целью получения продукции должны ограничиваться требованием сохранения структуры и средообразующих функций природных экосистем, видов и популяций [1]. Одним из важных подходов решения этой проблемы является выявление генетического

разнообразия популяций древесных видов растений, к которым относятся тополь чёрный (*Populus nigra* L.), играющий важнейшую роль при сохранении пойменных экосистем и используемый как источник древесины в промышленности и строительстве. Кроме этого, это вид относится в роду *Populus* L., который является модельным родом для изучения геномов древесных видов растений [2].

Тополь чёрный (*Populus nigra* L., *Salicaceae*) – анемофильное, двудомное растение. Его пыльца и семена разносятся ветром на большие расстояния. Этим определяется передача генов и значительное генетическое разнообразие этого вида. Следовательно, выявление взаимосвязи между генетической дистанцией и географическим расстоянием между популяциями на примере *P. nigra* является одним из важнейших аспектов в молекулярно-генетическом анализе дифференциации популяций древесных растений. Эта взаимосвязь является предметом пристального внимания и обсуждения, тем более, что такая корреляция установлена в Пермском крае у природных популяций тополя дрожащего [3], но является спорной при

Мартыненко Никита Александрович, магистрант. E-mail: nikita-martynenko@yandex.ru

Ахметов Артур Рамирович, ассистент. E-mail: bear.ah@mail.ru

Боронникова Светлана Витальевна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой ботаники и генетики растений, ведущий научный сотрудник. E-mail: SVBoronnikova@yandex.ru

Нечаева Юлия Сергеевна, младший научный сотрудник. E-mail: yulianechaeva@mail.ru

Пришнивская Яна Викторовна, инженер-исследователь. E-mail: yana_prishnivskaya@mail.ru

Никоношина Наталья Алексеевна, студентка

обсуждении результатов молекулярно-генетического анализа популяций *P. nigra* [4], так и других видов рода *Populus* [5–7]. Возможно, самым универсальным показателем генетической дистанции является генетическое расстояние, определенное по методу М. Нея [8] и показатель генетической дифференциации популяций С. Райта [9], так как именно они чаще всего используются в программах для компьютерного анализа генетических данных. Но рядом авторов для микросателлитных маркеров [10, 11], рекомендуется использовать и другие методы, а именно показатели Дж. Рейнольдса, Б. Вейра, С. Кокерхама [12], Л. Кавалли-Сфорца и А. Эдвардса [13]. Показатели генетической дифференциации популяций могут варьировать в зависимости от подхода их определения. Важным моментом является перечень условий, которые учитываются при кластеризации популяций, например, какая именно модель избрана для построения филогенетического дерева.

Цель работы: выявление генетической дифференциации на основании полиморфизма микросателлитных маркеров между четырьмя популяциями *P. nigra* Среднего и Южного Урала, анализ четырех методов определения генетической дифференциации и взаимосвязи генетического и географического расстояния между изученными популяциями *P. nigra*.

Материал и методика исследования. Объектами исследований являлись четыре популяции *P. nigra* из разных ботанико-географических районов Среднего и Южного Урала: первая популяция (Sp_1 или Спасская гора), расположенная в историко-природном комплексе «Спасская гора» в зоне островной Кунгурской лесостепи южной тайги Пермского края (Средний Урал); вторая популяция (B_2 или Бирск,) находится около г. Бирск Республики Башкортостан в лесостепном районе Южного Урала; третья популяция (St_3 или Стерлитамак), расположенная около г. Стерлитамак Республики Башкортостан в степном районе Южного Урала; четвертая популяция (In_4 или Инзер,) находится на территории Южно-Уральского заповедника в горном районе Южного Урала. Минимальное географическое расстояние между популяциями составило около 137 км (между St_3 и In_4), а максимальное – около 380 км (между Sp_1 и St_3).

Для молекулярно-генетического анализа *P. nigra* были собраны листья с 30–32 случайно избранных деревьев на расстоянии не менее 50 м друг от друга. Для выделения ДНК использовали модифицированную методику S.O. Rogers [14], в которой использовали в качестве детергента СТАВ+PVPP (цетилтриметиламмоний бромид + поливинилполипирролидон). При выделении ДНК из листьев брали навеску по 100 мг. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», USA) и для ПЦР выравнивали до 10 нг/мкл.

Наиболее соответствующими поставленной нами задаче генетическими маркерами являются высокополиморфные микросателлитные локусы. Кроме возможности оценки популяционно-генетических параметров, анализ нескольких полиаллельных микросателлитных локусов даёт возможность составить уникальный генетический портрет каждого дерева. Нами было избрано семь микросателлитных (SSR) локусов (ORNL214, PMGC14, wpms09, wpms20, wpms17, wpms14, wpms15) из базы данных микросателлитов Международного Консорциума по геномам тополей IPGC (International Populus Genome Consortium) SSR Resource и из двух статей [15, 16]. Все праймеры были уже проверены как на других популяциях *P. nigra* (в Европе), так и на других видах тополя – *P. trichocarpa*, *P. tremuloides*.

ПЦР, фрагментный анализ и компьютерный анализ данных проведен в Федеральном научно-исследовательском центре лесов, опасных природных явлений и ландшафта (Federal Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscape, Department of Genetics, Austria), в отделе исследований генома под руководством доктора Б. Хейнце (Вена, Австрия). Для амплификации SSR-методом мы использовали следующую программу: предварительная денатурация 98°C, 3 мин.; первые десять циклов 95°C, 30 сек.; t отж. 58°C, 30 сек., каждый цикл уменьшая температуру на 1°C; 72°C, 30 сек.; в последующих двадцати девяти циклах 95°C, 30 сек.; t отж. 53°C, 30 сек.; 72°C, 30 сек. Последний цикл элонгации длился 4 мин при 72°C. Фрагментный анализ произведен на секвенаторе GenomeLab GeXP производства Beckman Coulter (USA). Компьютерный анализ полученных данных произведен с помощью программного обеспечения GenomeLab GeXP [17]. Тест Мантела, предназначенный для выявления связей между генетической дифференциацией популяций и географическим расстоянием [18], а также расчёт показателя генетической дифференциации популяций С. Райта (Fst) (первый метод) проводился с помощью программы GenAlEx 6.5 [19]. На базе программы GENDIST пакета программ PHYLIP v 3.695 [20], были рассчитаны генетические дистанции М. Нея (второй метод), Дж. Рейнольдса (третий метод) и Л. Кавалли-Сфорца (четвёртый метод). Кластеризация по методу невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) и методу ближайшего соседа (Neighbor Joining Method)» проведена в модуле «Neighbor» того же пакета программ. Также в модулях «Kitsch» и «Fitch» пакета программ PHYLIP v. 3.695 проведена кластеризация по методу взвешенных наименьших квадратов по критерию В. Фитч-Марголиаша [21].

Визуализацию полученных дендрограмм проводили с помощью программы TREEVIEW [22]. Кластерный анализ исследуемых популяций *P. nigra* был проведен и с помощью программы STRUCTURE 2.3.4 [23]. Эта программа использует

методы Монте Карло по схеме марковской цепи (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), что позволяет минимизировать неравновесие Харди-Вайнберга и неравенство по сцеплению локусов в кластерном анализе индивидов [24]. Количество кластеров (K) находилось в диапазоне от 1 до 12. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [25] была использована веб-программа STRUCTURE Harvester [26]. Данная web-программа была использована для детекции подходящего количества кластеров путём их индивидуального перебора.

Таблица 1. Матрицы генетических расстояний между четырьмя популяциями *P. nigra*

1				
B_2	0,000			
In_4	0,288	0,000		
Sp_1	0,703	1,081	0,000	
St_3	0,101	0,167	0,786	0,000
2				
B_2	0,000			
In_4	0,288	0,000		
Sp_1	0,707	1,086	0,000	
St_3	0,101	0,168	0,790	0,000
3				
B_2	0,000			
In_4	0,094	0,000		
Sp_1	0,266	0,339	0,000	
St_3	0,036	0,084	0,288	0,000
4				
B_2	0,000			
In_4	0,142	0,000		
Sp_1	0,165	0,247	0,000	
St_3	0,047	0,064	0,160	0,000

Примечание: обозначения: 1. – генетическое расстояние по М. Нею, 2 – генетическое расстояние по Дж. Рейнольдсу, Б. Вейру и С. Кокерхаму, 3 – генетическое расстояние по Л. Кавалли-Сфорцу и А. Эдвардсу, 4 – по показателю генетической дифференциации С. Райту; обозначения популяций: B_2 – «Бирск», In_4 – «Инзер», Sp_1 – «Спаская гора», St_3 – «Стерлитамак»

Экспериментальная часть и обсуждение результатов. При использовании каждого из четырех анализируемых подходов наибольшее генетическое расстояние установлено между популяциями *P. nigra* In_4 и Sp_1. Значение этого показателя при определении методом М. Нея составило 1,081, Дж. Рейнольдса – 1,086, Л. Кавалли-Сфорца – 0,339, С. Райта – 0,247 (табл. 1). Следует отметить, географическое расстояние между популяциями In_4 и Sp_1 составляет 369 км, что меньше, чем между самыми отдаленными популяциями St_3 и Sp_1 (380 км). Самое низкое генетическое расстояние при каждом из четырех анализируемых методов (табл. 1) установлено между популяциями B_2 и St_3 – 0,047, 0,101, 0,101 и 0,036 и определено соответственно первым, вторым, третьим и четвёртым методом. Эти популяции менее

дифференцированы, потому что они произрастают в пойме одной реки – Белой. Между ними происходит обмен генами – распространение семян и вегетативных частей вниз по течению реки. Такую вариабельность значений генетического расстояния можно объяснить применением различных формул.

При построении филогенетических деревьев с использованием четырех анализируемых методов у дендрограмм различалась топология получившихся ветвей. Она была одинаковой при построении дендрограмм методом ближайшего соседа модуля «Neighbor» и методом наименьших квадратов по критерию Фитч-Марголиаша модуля «Fitch», но она отличалась от двух других при построении дендрограмм методом невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) модуля «Neighbor» и методом наименьших квадратов по критерию Фитч-Марголиаша модуля «Kitsch» (рис. 1).

Полученные результаты можно объяснить различием в методах кластеризации. Метод ближайшего соседа модуля «Neighbor» и метод наименьших квадратов по критерию В. Фитч-Марголиаша модуля «Fitch» не используют так называемые «эволюционные часы» [27], то есть не учитывают скорость преобразования генотипа в эволюции вида, строят неукоренившееся филогенетическое дерево и используют аддитивную модель построения. Метод невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) модуля «Neighbor» и метод наименьших квадратов по критерию В. Фитч-Марголиаша модуля «Kitsch» наоборот используют «эволюционные часы», строят укоренившееся дерево и используют ультраметрическую модель построения. Интересен тот факт, что ближе всех друг к другу в филогенетическом дереве находились популяции St_3 и In_4. Их близость, возможно, обуславливает преобладающий на территории республики Башкортостан юго-западный ветер [28], способствующий переносу пыльцы.

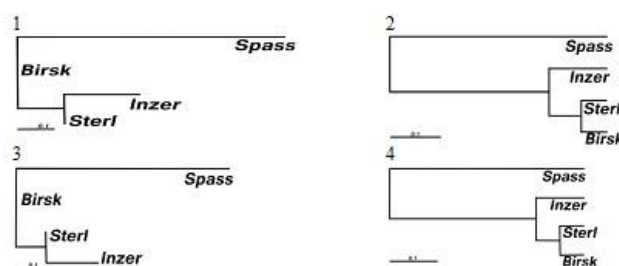


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на матрице значений генетического расстояния:

по М. Нею с помощью четырёх методов: 1 – метод ближайшего соседа (Neighbor Joining Method), 2 – метод невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA), 3 – метод взвешенных наименьших квадратов по критерию В. Фитч-Марголиаша в модуле «Fitch», 4 – метод взвешенных наименьших квадратов по критерию В. Фитч-Марголиаша в модуле «Kitsch»; обозначения популяций: «Spass» – «Спаская гора», «Inzer» – «Инзер», «Sterl» – «Стерлитамак», «Birsk» – «Бирск»

Дендрограммы с одинаковой топологией имеют различный масштаб длин ветвей. В качестве примера можно привести дендро-граммы (рис. 2), полученные на основании генетического расстояния по второму и четвёртому методам с помощью метода невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA). Метод наименьших квадратов по критерию В. Фитч-Марголиаша обоих модулей позволяет нам сравнить полученные дендрограммы по показателям суммы квадратов и среднего процента стандартного отклонения (табл. 2).

Наименьшие значения обоих показателей в обоих модулях, а, следовательно, и наименьший разброс полученных значений у параметра генетического расстояния отмечен в четвёртом методе, а наибольшие – в первом. Это свидетельствует о том, что топология и длина ветвей оптимальнее в случае с использованием параметра генетического расстояния, определенным четвёртым методом Л. Кавалли-Сфорца и А. Эдвардса. Во всех полученных дендрограммах наблюдалось обособление

популяции Sp_1, иногда даже с очень длинной ветвью. Это также подтверждается результатом кластерного анализа, проведенного с помощью STRUCTURE 2.3.4 (рис. 3).

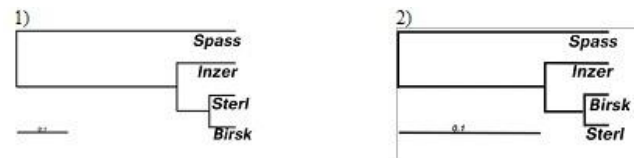


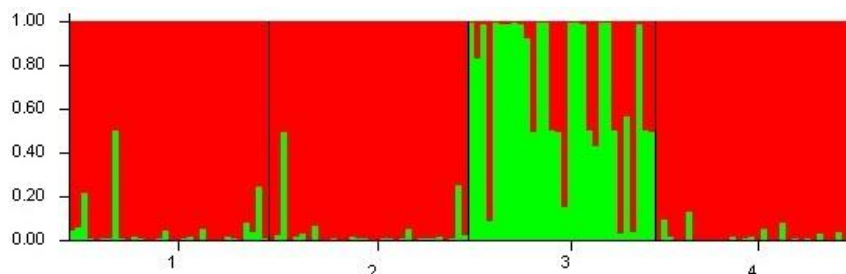
Рис. 2. Дендрограммы, полученные на основании генетического расстояния, определенного по методу М. Нея (1) и Л. Кавалли-Сфорца и А.Эдвардса (2) с помощью метода невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA); обозначения популяций: «Spass» – «Спасская гора», «Inzer» – «Инзер», «Sterl» – «Стерлитамак», «Birsk» – «Бирск»

Таблица 2. Сумма квадратов и средний процент стандартного отклонения по изученным показателям генетической дифференциации в модулях «Fitch» и «Kitsch»

Модуль/ показатель		Первый метод (по Райту)	Второй метод (по М. Нею)	Третий метод (по Дж. Рейнольдсу)	Четвертый метод (по Л. Кавалли-Сфорцу)
«Fitch»	сумма квадратов	0,07703	0,02386	0,02386	0,00045
	средний процент стандартного отклонения	8,77661	4,88504	4,88504	0,66916
«Kitsch»	сумма квадратов	0,68400	0,43100	0,43100	0,07200
	средний процент стандартного отклонения	26,15798	20,75619	20,75619	8,45951

При выявлении корреляции между генетическим и географическим расстоянием с помощью теста Мантелы получены высокие коэффициенты детерминации (R^2), но они различны при анализируемых четырех методах. Тест Мантелы, проведенный для каждого параметра генетической дифференциации, показал высокую корреляцию между значениями географического и генетического расстояния. Очень тесная корреляция наблю-

далась также и у изученных ранее уральских популяций *P.tremula* ($r = 0,9$ [3]). Так, при использовании первого, второго, третьего и четвертого методов значения коэффициента детерминации составляли 0,694, 0,787, 0,703 и 0,780 соответственно (рис. 4). Исследования топей в Европе показали низкие показатели R^2 у таких видов как *P. tomentosa* ($R^2 = 0,007$ [6]), *P.tremuloides* ($R^2 = 0,202$ [7]), *P.euphratica* ($R^2 = 0,10$ [5]), так и *P.nigra* ($R^2 = 0,07$ [4]).



Примечание: по оси ординат – доля частот аллелей соответствующего кластера, по оси абсцисс – порядковый номер популяций, где 1 – «Бирск», 2 – «Инзер», 3 – «Спасская гора», 4 – «Инзер»; тёмным (красным) цветом обозначен первый кластер (генотипы популяций из Республики Башкортостан), а светлым (зеленым) – второй (генотипы популяции Спасская гора из Пермского края)

Рис. 3. Кластерный анализ генотипов изученных популяций *P. nigra* Урала с помощью программы STRUCTURE

Выводы: установлено, что для определения генетической дифференциации изученных популяций *P. nigra* с использованием полиморфизма кодоминантных маркеров, таких как SSR-PCR маркеры, наиболее оптимальным является метод Л. Кавалли-Сфорца и А.Эдвардса. Тем не менее, общие закономерности генетической дифференциации сохраняются при каждом из четырех проанализированных методов. Доказана правильность кластеризации изученных популяций и высокая корреляция между генетическим и географическим расстоянием между популяциями, так как высок коэффициент детерминации (R^2) показателя генетической дифференциации (0,694 по методу С.Райта, 0,787 по методу М.Нея). Эти данные совпадают с результатами, полученными при изучении семи популяций *P. tremula* Пермского края [3] на основании полиморфизма межмикросателлитных маркеров. При анализе в программе STRUCTURE 2.3.4 четыре популяции *P.nigra* разделились на 2 кластера: популяции из Республики Башкортостан и из Пермского края. Данные о генетической дифференциации популяций необходимы для оценки и сопоставления состояния генофонов древесных видов растений и создания программ сохранения генетических ресурсов.

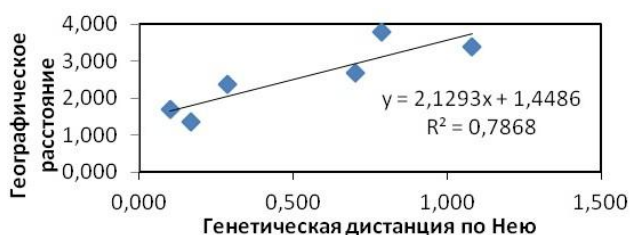


Рис. 4. Зависимость между генетическим расстоянием по методу М.Нея и географическим расстоянием изученных четырех популяций *P.nigra*

Выражаем искреннюю благодарность Федеральному научно-исследовательскому центру лесов, опасных природных явлений и ландшафта, отделу исследований генома, Вена, Австрия (Federal Research and Training Centre for Forests, Natural Hazards and Landscape, Department of Genetics, Austria) и руководителю отдела геномики – доктору Бертольду Хайнце и сотруднице отдела Ренате Слански.

Работа выполнена при финансовой поддержке задания 2014/153 государственных работ в сфере научной деятельности в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки России (проект 144, № гос. рег. 01201461915).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Букварева, Е.Н. Принцип оптимального разнообразия биосистем и стратегия управления биоресурсами / Е.Н. Букварева, Г.М. Алещенко // Государственное управление в XXI веке: традиции и инновации. – М., 2006. С. 204-210.
2. Brunner, A.M. Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species / A.M. Brunner, V.B. Busov, S.H. Strauss // Trends in plant science. 2004. V. 9, №. 1. P. 49-56.
3. Svetlakova, T.N. Genetic diversity and differentiation in Ural populations of the aspen, *Populus tremula* L., as revealed by inter-simply sequence repeat (ISSR) markers / T.N. Svetlakova, S.V. Boronnikova, Y.A. Yanbaev // Silvae Genetica. 2014. V. 63, №. 1-2. P. 39-41.
4. Imbert, E. Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system / E. Imbert, F. Lefèvre // Journal of Ecology. 2003. V. 91, №. 3. P. 447-456.
5. Wang, J. Genetic variation within and between populations of a desert poplar (*Populus euphratica*) revealed by SSR markers / J. Wang et al. // Annals of forest science. 2011. V. 68, №. 6. P. 1143-1149.
6. Du, Q. Genetic diversity and population structure of Chinese white poplar (*Populus tomentosa*) revealed by SSR markers / Q. Du et al. // Journal of Heredity. 2012. V. 103, №. 6. – C. 853-862.
7. Callahan, C.M. Continental-scale assessment of genetic diversity and population structure in quaking aspen (*Populus tremuloides*) // Journal of biogeography. 2013. V. 40, №. 9. P. 1780-1791.
8. Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89, №. 3. P. 583-590.
9. Wright, S. Isolation by distance // Genetics. 1943. V. 28, №. 2. P. 114.
10. Takezaki, N. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA / N. Takezaki, M. Nei // Genetics. 1996. V. 144, №. 1. P. 389-399.
11. Chapuis, M.P. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation / M.P. Chapuis, A. Estoup // Molecular biology and evolution. 2007. V. 24, №. 3. P. 621-631.
12. Reynolds, J. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance / J. Reynolds, B.S. Weir, C.C. Cockerham // Genetics. 1983. V. 105, №. 3. P. 767-779.
13. Cavalli-Sforza, L.L. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures / L.L. Cavalli-Sforza, A.W.F. Edwards // American journal of human genetics. 1967. V. 19, №. 3 Pt. 1. P. 233.
14. Rogers S.O. Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA // Conservation of Plant Genes II: Utilization of Ancient and Modern DNA. 1994. P. 47-67.
15. Van der Schoot, J. Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.) / J. van der Schoot et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2000. V. 101, №. 1-2. P. 317-322.
16. Smulders, M.J.M. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.) / M.J.M. Smulders et al. // Molecular Ecology Notes. 2001. V. 1, №. 3. P. 188-190.
17. David, V.A. Automated DNA detection with fluorescent-based technologies / V.A. David, M. Menotti-Raymond // Molecular Genetic Analyses of Populations. 1998. P. 337-370.
18. Mantel, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer research. 1967. V. 27, №. 2, Part 1. P. 209-220.
19. Peakall, R.O.D. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R.O.D. Peakall, P.E. Smouse // Molecular ecology notes. 2006. V. 6, №. 1. P. 288-295.
20. Felsenstein, J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package // Cladistics. 1989. № 5. P. 164-166.
21. Fitch W.M. Evidence suggesting a non-random character to nucleotide replacements in naturally occurring

- mutations // Journal of molecular biology. 1967. V. 26, №. 3. P. 499-507.
22. Page, R.D.M. TreeView - An application to display phylogenetic trees on personal computer // Comp. Appl. Biol. Sci. 1996. V. 12. P. 357-358.
 23. Falush, D. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies / D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard // Genetics. 2003. V. 164, №. 4. P. 1567-1587.
 24. Smulders M.J.M. Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration / M.J.M. Smulders et al. // Forest Ecology and Management. 2008. V. 255, №. 5. P. 1388-1399.
 25. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // Molecular ecology. 2005. V. 14. №. 8. P. 2611-2620.
 26. Earl, D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D.A. Earl et al. // Conservation genetics resources. 2012. V. 4, №. 2. P. 359-361.
 27. Mangelsdorf, P.C. Evolution under domestication // American Naturalist. 1952. P. 65-77.
 28. Научно-прикладной справочник по климату СССР. - Л.: Гидрометеиздат. Серия 3. Части 1-6, вып. 9. 1990. 557 с.

GENETIC DIFFERENTIATION ON THE BASE OF MICROSATELLITE MARKERS POLYMORPHISM OF BLACK POPLAR POPULATIONS IN MIDDLE AND SOUTH URALS

© 2015 N.A. Martynenko¹, A.R. Akhmetov², S.V. Boronnikova¹, Yu.S. Nechaeva¹,
Ya.V. Prishnivskaya¹, N.A. Nikonoshina¹

¹ Perm State National Research University

² Bashkir State Agrarian University, Ufa

For creating programs for the conservation of genetic resources, reforestation and conservation of forest ecosystems is necessary to choose the best approaches, that determine genetic differentiation of populations of woody plant species on the basis of polymorphism of molecular markers such as microsatellite tandem repeats (SSR (Simple Sequence Repeat) -PCR markers). Genetic distances among the four studied populations of *Populus nigra* L in the Urals are established by using four approaches. The highest value of genetic distance ($D=1,086$), based on the Reynolds, Weir and Cockerham's parameter of genetic distance, was between populations near city Sterlitamak in Bashkortostan Republic and in protected area "Spasskaya Gora" in Perm krai. The lowest value, based on the Cavalli-Sforza and Edwards's parameter of genetic distance, was between populations near city Sterlitamak and near town Inzer in Bashkortostan Republic ($D=0,036$). When comparing clustering methods such as a Unweighted Pair Group Method (UPGMA), the Neighbor Joining Method and weighted least-squares criterion of Fitch-Margoliash, found that, for the determination of genetic differentiation of studied populations *P. nigra*, using polymorphism of codominant markers such as SSR-PCR markers, method of L. Cavalli-Sforza and A. Edwards is the most optimal. When clustering in the program STRUCTURE 2.3.4 studied populations of black poplar were divided into two clusters: the populations of the Republic of Bashkortostan and population in the Perm krai. The high correlation was between genetic differentiation and geographic distance of four studied populations of *P. nigra*, based on the Mantel test. The high correlation was between genetic and geographic distance between the studied populations of *P. nigra*, because the coefficient of determination (R^2) was high (0.694 by the method of C.Wright, 0.787 by the method of M. Nei).

Key words: *Populus nigra* L., populations, clustering, microsatellites, genetic distance, geographic distance, genetic diversity, conservation of forest genetic resources

Nikita Martynenko, Undergraduate Student. E-mail:

nikita-martynenko@yandex.ru

Arthur Akhmetov, Assistant. E-mail: bear.ah@mail.ru

Svetlana Boronnikova, Doctor of Biology, Head of the Botany and Plants Genetics Department, Leading Research Fellow. E-mail: SVBoronnikova@yandex.ru

Yuliya Nechaeva, Minor Research Fellow. E-mail:

yulianecheva@mail.ru

Yana Prishnivskaya, Engineer-Researcher. E-mail:

yana_prishnivskaya@mail.ru

Nataliya Nikonoshina, Student