ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

DOI 10.21178/2079-6080.2022.4.18
УДК 575.174.015.3:582.475

Тестирование микросателлитных маркеров для оценки уровня генетического разнообразия *Pinus sylvestris* L.

© Р.М. Камалов, М.Ю. Петюренко, А.П. Дегтярева

Testing of microsatellite markers to assess the level of genetic diversity of *Pinus sylvestris* L.

R.M. Kamalov, M.Yu. Peturenko, A.P. Degtyareva (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology)

The article presents the results of testing 17 microsatellite loci for the purpose of their polymorphism and the effectiveness of the analysis of the structure of the population *Pinus sylvestris* L. The assessment of the variability of molecular markers was tested in forest plantations of this species growing in the southern border of the steppe zone of the Voronezh region and in the clone archives of the Ulyanovsk region. Based on the results of experimental studies, it was found that a high level of allelic diversity as a result of inflammation of the *Pinus sylvestris* L. populations studied by us was found from the entire sample for 5 loci: lw_isotig21953, lw_isotig27940, lw_isotig20215, PtTx4001, SPAC 12.5. The number of identified alleles for these loci varied from 12 to 6. The least informative in our studies were loci lw_isotig02842 and lw_isotig07383. It has been established that *Pinus sylvestris* L. trees in clone archives were distinguished by a higher genetic diversity, including allelic diversity, compared to forest plantations growing under pessimal conditions for the species. A high correlation (0,75) was shown between the indices of the observed heterozygosity of individual loci in the Voronezh and Ulyanovsk populations and between the indices of the Wright fixation index – 0,77. An analysis of the genetic structure of the studied populations made it possible to conduct a comparative analysis of the genetic diversity of *Pinus sylvestris* L. in Russia, showing their high efficiency. From this point of view, the use of 17 SSR molecular markers tested by us can be useful in determining the genetic diversity of populations, identifying and reflecting the direction of the adaptive potential, and in general for characterizing the population structure of *Pinus sylvestris* L. in different regions of Russia.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., molecular markers, microsatellite loci, population genetic structure

Тестирование микросателлитных маркеров для оценки уровня генетического разнообразия *Pinus sylvestris* L.

Р.М. Камалов, М.Ю. Петюренко, А.П. Дегтярева

В статье представлены результаты тестирования 17 микросателлитных локусов с целью выявления их полиморфизма и эффективности анализа структуры популяций сосны обыкновенной. Оценка изменчивости молекулярных маркеров была протестирована в лесных культурах этой породы, произрастающих на южной границе степной зоны Воронежской области и в клоновых архивах в Ульяновской области. На основании экспериментальных данных показано, что наибольший уровень аллельного разнообразия в обеих изучаемых нами популяциях сосны обыкновенной обнаружен из всей выборки для 5 локусов: lw_isotig21953, lw_isotig27940, lw_isotig20215, PtTx4001, SPAC 12.5. Количество выявленных аллелей по этим локусам варьировало от 12 до 6. Наименее информативным в наших исследованиях оказались локусы lw_isotig02842 и lw_isotig07383. Установлено, что деревья сосны обыкновенной в клоновых архивах отличались более высоким генетическим разнообразием, в том числе и аллельным, по сравнению с лесными культурами, произрастающими в пессимальных для вида условиях. Показано наличие высокой корреляции (0,75) между показателями наблюдаемой гетерозиготности отдельных локусов в Воронежской и Ульяновской популяциях и между показателями индекса фиксации Райта – 0,77. Анализ генетической структуры изученных популяций позволил провести сравнительный анализ генетического разнообразия *Pinus sylvestris* L. на территории России, показывая их высокую эффективность. С этой точки зрения, применение 17 SSR-молекулярных маркеров, протестированных нами, может быть полезным при определении генетического разнообразия популяций, выявления и отражения направленности адаптационного потенциала, и в целом для характеристики популяционной структуры сосны обыкновенной в разных регионах России.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, молекулярные маркеры, микросателлитные локусы, генетическая структура популяции

Камалов Равиль Мингазович – канд. с.-х. наук, старший научный сотрудник, заведующий отделом селекции и семеноводства

E-mail: kamalov.r.m12@gmail.com

Петюренко Марта Юрьевна – канд. с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, молекулярной генетики и физиологии растений

E-mail: forestgenetic@mail.ru

Дегтярева Алина Петровна – младший научный сотрудник лаборатории экологической генетики

E-mail: ali.serdyukova@yandex.ru

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105

Тел.: 8 (473) 253-71-89

E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

Введение

В последние десятилетия успешное внедрение в лесную генетику методов молекулярно-генетических исследований с помощью аллозимов и ДНК-методов позволило российским и зарубежным исследователям получить качественно новую информацию о генетическом разнообразии лесных древесных растений. К настоящему времени накоплены обширные материалы по генетической структуре, уровням внутри- и межпопуляционной изменчивости, степени генетической дифференциации популяций в пределах ареалов основных лесообразующих хвойных пород: сосны обыкновенной, лиственницы, ели и пихты и др.

У ряда видов кедровых сосен по стандартному набору аллозимных локусов были определены количественные оценки основных характеристик внутри- и межвидовой изменчивости. Установлено, что уровень их генного разнообразия уменьшается в ряду от распространённых видов к менее распространенным: *Pinus pumila* > *P. koraiensis* > *P. sibirica* > *P. cembra*. На основании результатов, полученных с помощью этих локусов, обосновано выделение северных популяций кедра сибирского в особую группу до подвидового уровня вследствие их ярко выраженных различий от остальных популяций [8, 9, 10, 13].

С использованием метода аллозимного анализа выявлена значительная однородность популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в пределах регионов Скандинавии, Центральной, Западной и Восточной Европы. В то же время показана генетическая специфика групп популяций в некоторых маргинальных частях ареала их произрастания [14].

Несмотря на то, что биохимические маркеры (аллозимы) представляют собой многомолекулярные формы ферментов, которые кодируются различными генами и имеют кодоминантный тип наследования, к их недостаткам можно отнести ограниченное количество ферментов, их относительно меньший полиморфизм, наличие органной специфичности, зависимость от методов экстракции, а также влияние на их экспрессию этапов онтогенеза. С появлением основанных на анализе полиморфизма ДНК молекулярных маркеров, в том числе микросателлитных, или SSR-маркеров (Simple Sequence Repeats), в популяционно-генетических исследованиях лесных древесных растений, в частности хвойных, стали все чаще использоваться маркеры ядерного генома, подходящие для генетической идентификации как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях.

Авторами предложены новые SSR-локусы для лесообразующих видов хвойных пород, в том числе лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour), маркеры митохондриальной ДНК (мтДНК) для популяционно-генетических и филогеографических исследований [1, 11, 15]. На сегодняшний день разработаны и описаны группы хлоропластных (cpSSR) и SSR-маркеров из транскрибируемых областей (EST-SSR), выявляющие генетическое разнообразие в функционально значимых частях генома сосны, предлагаются панели для мультиплексов ядерных микросателлитов [5, 18, 19, 20, 21, 25, 27]. В частности, на основе полиморфизма cpSSR-локусов показана увеличенная дифференциация причерноморских популяций *Pinus brutia* по сравнению с *P. nigra, P. sylvestris* и популяцией *P. brutia* из основной части ареала, что предположительно может являться следствием малого размера популяций и длительной их изоляции друг от друга [16].

Следует особо отметить, что SSR-локусы наследуются кодоминантно и считаются нейтральными маркерами. Кроме того, микросателлиты, разработанные для одного вида, часто можно использовать для других родственных видов за счет сохранения фланкирующих

областей в популяциях. В то же время у EST-SSR-локусов коэффициент переноса может достигать 100 % в разных подсекциях рода *Pinus* [22]. Установлено, что большинство праймеров амплифицируют геномные области ожидаемого размера у большинства исследованных видов сосен – *P. taeda*, *P. ponderosa, P. contorta* ssp. *latifolia, P. sylvestris*. Все это позволяет на сегодняшний день получать качественно новую информацию о генетическом разнообразии лесных древесных растений.

Несмотря на то, что зарубежными и российскими авторами в литературе приводятся сведения о широком применении ядерных микросателлитных маркеров для оценки дифференциации популяций разных видов хвойных, в том числе и сосны, отбор высокополиморфных маркеров для проведения мониторинга генетических ресурсов сосны обыкновенной остается актуальной задачей.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования служили 35-летние культуры сосны обыкновенной в Кантемировском районе Воронежской области, произрастающие в пессимальных для региона в целом условиях (степная природная зона) [24] и 41–42-летние клоновые архивы плюсовых деревьев в Кузоватовском районе Ульяновской области (природная зона – лесостепь). Объем популяционной выборки для оценки изменчивости молекулярных генетических маркеров и генетико-статистических параметров в насаждении лесных культур составил 60 деревьев, в клоновых архивах – 45 клонов.

Выделение суммарной ДНК из хвои *Pinus sylvestris* L. проводили с использованием набора diaGene (ООО «Диаэм», Россия) для растительной ткани по разработанной нами методике [12]. Количественное содержание нуклеиновой кислоты в исследуемых образцах *Pinus sylvestris* L. измеряли на приборе Qubit 2.0 с использованием реагентов Qubit dsDNA BR AssayKit согласно инструкции производителя.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали готовую смесь ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). При постановке реакции в смесь добавляли прямой и обратный праймер по 0,2–0,4 мкМ каждого, матрицу ДНК – до 25 нг на реакцию и стерильную воду – до 25 мкл. Результаты амплификации визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 3,5 % агарозе марки MS-12. Распознавание размера продуктов амплификации на электрофореграмме осуществлялось при помощи программного обеспечения «Labimage», version: 4.2.3. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

В исследовании нами были отобраны SSR-маркеры для видов сосны, созданные с использованием геномных библиотек для вида *Pinus sylvestris* L. [25], *Pinus taeda* L. [18, 19, 27], а также EST-SSR-локусы, изначально разработанные для оценки биологического разнообразия *P. sylvestris* var. *mongolica,* произрастающей на территории Монголии, на основании 31653 EST-последовательности этого вида [20]. Таким образом, по результатам литературного обзора для оценки генетической структуры *Pinus sylvestris* L. нами были отобраны следующие олигонуклеотидные последовательности ядерных микросателлитных локусов: 14 EST-SSRs (транскрибируемая часть ядерной ДНК), подобранных к локусам lw_isotig04204, lw_isotig07383, lw_isotig10603, lw_isotig17679, lw_isotig21953, lw_isotig27940, lw_isotig00080, lw_isotig00081, lw_isotig01420, lw_isotig02842, lw_isotig04195, lw_isotig04306, lw_isotig05123, lw_isotig20215 и 3 ядерных микросателлитных локуса (nSSRs) – PtTx4011, PtTx4001, SPAC 12.5. Перечень и характеристика отобранных для исследования микросателлитных локусов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов рода *Pinus*, использованных в работе (по литературным данным)

Локус	Мотив	Размер фрагмента, п. н.	A	H_o
Pinus sylvestris var. *mongolica* [20]				
EST-SSRs				
lw_isotig04204	$(CGGCT)_5$	230	2	0,437
lw_isotig10603	$(CAG)_7$	196	2	0,437
lw_isotig17679	$(TTAA)_5$	277	3	0,437
lw_isotig21953	$(ATGGG)_7$	208	7	0,625
lw_isotig27940	$(TGGA)_5$	231	3	0,177
lw_isotig00080	$(CCG)_6$	177	3	0,297
lw_isotig00081	$(CCG)_6$	290	3	0,212
lw_isotig01420	$(CTG)_5$	174	3	0,787
lw_isotig04195	$(GAG)_5$	189	4	0,446
lw_isotig04306	$(TCC)_7$	196	3	0,500
lw_isotig05123	$(GAG)_6$	166	2	0,145
lw_isotig20215	$(TA)_7$	186	8	0,812
lw_isotig07383	$(GAT)_8$	191	3	0,369
lw_isotig02842	$(AGA)_5$	229	2	0,125
Pinus taeda L. [18, 19, 27]				
nSSRs				
PtTx4011	$(CA)_{20}$	303	5	Нет данных
PtTx4001	$(GT)_{15}$	224	8	Нет данных
Pinus sylvestris L. [25]				
nSSRs SPAC 12.5	$(GT)_{20}(GA)_{10}$	155	10	Нет данных

Примечания. Мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; п. н. – пары нуклеотидов; A – количество аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность.

Основные статистики аллельного разнообразия – ожидаемая (H_e) и наблюдаемая (H_o) гетерозиготность, количество аллелей в выборке, число эффективных аллелей (n_e), среднее количество аллелей на локус (A), коэффициент инбридинга) оценивались по микросателлитным данным в программе GenAlEx6.503 [23]. Оценка генетической дифференциации популяций сосны в клоновых архивах проводилась на основе частот аллелей с использованием анализа молекулярной дисперсии (Analysis of Molecular Variance, AMOVA). Достоверность индекса фиксации F_{st} при попарных сравнениях генетической обособленности популяций определяли по результатам 999 пермутаций в режиме Codom-Microsat в программе GenAlEx6.503.

Результаты и их обсуждение

Микросателлитный анализ образцов *Pinus sylvestris* L. в клоновых архивах и лесных культурах обнаружил значительное генетическое разнообразие по исследуемым локусам (табл. 2).

Таблица 2

Полиморфизм SSR-локусов у *Pinus sylvestris* L., произрастающих на территории Воронежской и Ульяновской областей

Локус	Ульяновская область			Воронежская область		
	Ориентировочный размер фрагмента, п. н.	A	H_o	Ориентировочный размер фрагмента, п. н.	A	H_o
lw_isotig04204	215–235	2	0,600	230–250	4	0,458
lw_isotig10603	177–205	6	0,178	170–220	3	0,327
lw_isotig17679	240–320	7	0,933	277–305	2	0,214
lw_isotig21953	190–280	11	0,600	190–270	12	0,550
lw_isotig27940	220–245	6	0,022	215–270	8	0,322
lw_isotig00080	177–210	3	0,044	165–180	4	0,083
lw_isotig00081	166–290	3	0,889	190–290	2	1,000
lw_isotig01420	167–185	4	0,000	170–176	3	0,050
lw_isotig04195	180–202	4	0,000	189–210	2	0,017
lw_isotig04306	170–200	7	0,089	190–200	2	0,283
lw_isotig05123	160–175	4	0,000	170–180	2	0,017
lw_isotig20215	165–200	6	0,000	186–205	4	0,067
lw_isotig07383	191–200	2	0,000	191–200	2	0,125
lw_isotig02842	205–220	4	0,000	229	1	0,000
PtTx4011	225–295	8	0,089	277–285	2	0,034
PtTx4001	190–245	5	0,067	200–230	4	0,017
SPAC 12.5	145–200	7	0,044	130–210	4	0,196

Примечания. п. н. – пары нуклеотидов; A – количество аллелей; H_o – наблюдаемая гетерозиготность.

Размер амплифицирующихся последовательностей у *Pinus sylvestris* L. по всем 17 микросателлитным локусам в выборках сосны из Воронежской и Ульяновской областей был близок к литературным данным и составлял ориентировочно от 130 до 320 п. н. В нашем эксперименте было отмечено некоторое несовпадение фактических и ожидаемых длин амплифицируемых фрагментов ДНК, что случается довольно часто и, как правило, зависит от разрешающей способности при выявлении полиморфизма ДНК или от происхождения и видовой принадлежности образцов. Значение параметра, определяющего среднее число аллелей на локус (A), варьировало также в зависимости от SSR-локуса и региона произрастания сосны обыкновенной. Так, у *Pinus sylvestris* L. получены несколько отличные по сравнению с P. *sylvestris* var. *mongolica* результаты по количеству аллелей в SSR-локусах. В работе P. Fang et al. [20] для локуса lw_isotig02842 было выявлено более одного аллеля (A = 2). Полученные ранее И.И. Камаловой [7] результаты отчетливо указывают на существование различий в количестве аллелей для разных типов локусов. К примеру, при характеристике популяционной структуры *Pinus sylvestris* L. в зоне тайги (Республика Коми, Ухтинский лесхоз) один из изоферментных локусов (GOT-1) оказался мономорфным во всех 4-х изученных насаждениях. При этом в популяциях сосны разных регионов России и Европы он являлся полиморфным. Возможно, это обусловлено различиями в происхождении видов или особыми лесорастительными условиями, присущими данным таежным

популяциям сосны. В работе других исследователей [2] также был выявлен EST-SSRs-локус Pa_33, который в одной из пяти популяций ели европейской (*Picea abies*) оказался мономорфным. Несмотря на то, что локус lw_isotig02842 не выявил полиморфизма между образцами у популяции сосны из Центрального Черноземья, он может быть полезен при смене географического расположения популяций в пределах ареала. В то же время при отнесении локуса в популяции к мономорфному необходимо учитывать погрешность каждого метода, чтобы избежать некорректной интерпретации полученных данных.

Наибольшее аллельное разнообразие в обеих выборках сосны в нашем исследовании было обнаружено в локусах lw_isotig21953, lw_isotig27940, lw_isotig20215, PtTx4001, SPAC 12.5. Так, показатель A для локуса lw_isotig21953 в клоновых архивах сосны составил 11 аллелей, в лесных культурах – 12. Следует отметить, что в работе P. Fang et al. [20] по этому локусу также было обнаружено максимальное число аллелей (A = 7). Для локуса lw_isotig27940 количество аллелей на локус в нашем исследовании варьировало от 6 до 8 в зависимости от популяций. Полученные данные по полиморфизму для этих локусов подтверждаются работами других исследователей. Так, в цитируемых источниках значение показателя A для локуса lw_isotig21953 составляло 9 и 14 аллелей, для локуса lw_isotig27940 – 16 и 5 аллелей [5, 17].

Необходимо отметить, что количество аллелей для SSR-локусов отличалось в зависимости от региона произрастания. Так, в насаждении сосны обыкновенной из Воронежской области наименее изменчивыми оказались следующие 6 EST-SSR-локусов: lw_isotig04306, lw_isotig00081, lw_isotig07383, lw_isotig05123, lw_isotig17679 и lw_isotig04195, имеющие по 2 аллельных варианта. Среди nSSRs-локусов наименее изменчивым был PtTx4011, имеющий также по 2 аллеля. В клоновых архивах сосны наименее изменчивыми были локусы lw_isotig07383 и lw_isotig04202. Количество аллелей составило 2.

В целом, в клоновых архивах уровень аллельного разнообразия был выше относительно насаждения лесных культур. Для ядерных локусов PtTx4011 и SPAC 12.5 было обнаружено 8 и 7 аллелей, в насаждении лесных культур – 2 и 4 соответственно. Такая же тенденция наблюдалась для локусов lw_isotig04306, lw_isotig10603, lw_isotig17679. Согласно полученным нами данным, среднее число аллелей на локус в популяции сосны обыкновенной в клоновых архивах составило 5,235, количество эффективных аллелей (ne) – 3,918, в то время как в насаждении лесных культур показатель A был несколько ниже, составив 3,500, а числовое значение показателя ne равнялось 2,466. Это можно объяснить особой ценностью архивов клонов сосны обыкновенной в Кузоватовском лесничестве Ульяновской области, отличающихся уникальной концентрацией объектов лесного семеноводства, характеризующихся высоким агротехническим уровнем работ при их создании и хорошим текущим состоянием насаждений.

Для целей сохранения генетических ресурсов, помимо среднего числа аллелей на локус, наиболее важными являются значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Их величины были оценены как для отдельных локусов, так и для изучаемых популяций в целом. Выявлено наличие высокой корреляции (0,75) между показателями наблюдаемой гетерозиготности отдельных локусов в Воронежской и Ульяновской популяциях. Установлено, что усредненный уровень H_o анализируемых SSR-локусов ранжировался от 0,000 (локусы lw_isotig01420, lw_isotig04195, lw_isotig05123, lw_isotig20215, lw_isotig07383, lw_isotig02842) до 0,933 (локус lw_isotig17679) для образцов сосны, произрастающей в Кузоватовском лесничестве, и от 0,000 (lw_isotig02842, PtTx3107) до 1,000 (lw_isotig00081) – у Кантемировской популяции, подтверждая существование полиморфизма во всех исследуемых локусах.

Согласно полученным данным, доля по-

лиморфных локусов у лесных культур сосны составила от 92,9 % (EST-SSR) до 100 % (nSSRs), в клоновых архивах – от 94,1 % (EST-SSR) до 100 % (nSSRs) соответственно. Наблюдаемые различия в показателях полиморфности связаны с разной мономорфностью локусов. Так, все 3 ядерных локуса (PtTx4001, PtTx4011, SPAC 12.5) в исследовании оказались полиморфными, в то время как один из локусов lw_isotig02842, отнесённый к типу EST-SSR при оценке генетического полиморфизма у *Pinus sylvestris* L., был мономорфным. В то же время в литературе имеются данные, что в отношении локуса SPAC 12.5 встречались некоторые проблемы с генотипированием или слабой амплификацией, а распределение аллелей в локусе PtTx4011 значительно отклонялось от равновесия Харди-Вайнберга [26].

На основании аллельных частот SSR-локусов для популяции сосны обыкновенной в клоновых архивах Ульяновской области нами были рассчитаны параметры генетической изменчивости с помощью индексов фиксации Райта. Выявлен дефицит гетерозигот относительно популяции и вида (F_{is} = 0,634, F_{it} = 0,655). Результаты статистической обработки индексов фиксации F_{st} методом AMOVA с использованием 17 SSR-локусов показали, что внутрипопуляционная изменчивость составляет 85 %. В то же время для Воронежской популяции сосны также отмечены положительные значения индекса фиксации Райта (F_{is} = 0,577), указывающие на дефицит гетерозигот в популяции, что может говорить о наличии в его семенной продукции повышенной доли инбредного потомства. Для сосны обыкновенной, произрастающей в Воронежской и в Ульяновской областях, выявлена высокая корреляция (коэффициент равнялся 0,77) между значениями индекса фиксации Райта.

Проведенные исследования по результатам тестирования 17 SSR-локусов позволили выполнить сравнительный анализ популяционно-генетических параметров на территории России. Как отмечено выше, в целом уровень наблюдаемой гетерозиготности оказался несколько ниже, чем в цитируемых источниках, и относительно ниже значений этого показателя, установленного ранее для сосны обыкновенной на территории Республики Марий Эл, Архангельской, Кировской областей, в Республике Коми и Карелия и на Северо-Западе России в целом. Полученные усредненные параметры по показателю ожидаемой гетерозиготности молекулярных маркеров были также несколько ниже, чем у популяций, произрастающих в Архангельской и Кировской областях, в Республике Коми, но коррелируют с усредненными значениями для сосны из республик Марий Эл и Карелии, а также по северо-западной части территории Российской Федерации в целом (табл. 3).

Таблица 3

Оценка внутривидовой изменчивости *Pinus sylvestris* L. на основе SSR-локусов

Выборка/Район	Показатели внутривидовой изменчивости				Ссылка
	N_e	A	H_o	H_e	
Лесные культуры, Воронежская область	2,466	3,500	0,208	0,493	-
Клоновые архивы, Ульяновская область	3,918	5,235	0,210	0,694	-
Старожилькое участковое лесничество, Республика Марий Эл	3,46–3,68	6,400–7,200	0,580–0,600	0,660–0,670	[3]

Выборка/Район	Показатели внутривидовой изменчивости				Ссылка
	N_e	A	H_o	H_e	
Веселовская, Республика Коми	5,47	7,778	0,251	0,738	[17]
Березовская, Кировская область	5,63	9,111	0,276	0,784	[17]
Березниковская, Архангельская область	6,67	9,667	0,272	0,810	[17]
Республика Карелия	3,23–5,86	7,500–10,500	0,280–0,500	0,510–0,680	[4]
Северо-западная территория России в целом	2,45–2,79	3,600–4,600	0,613–0,764	0,555–0,608	[6]

Стоит особо отметить, что приведенные оценки внутривидовой изменчивости *Pinus sylvestris* L. на основе SSR-локусов являются ориентировочными и характеризуют общую тенденцию. Это связано с тем, что в исследованиях авторы использовали разный набор микросателлитных локусов и разные по количеству деревьев выборки. Так, например, для оценки полиморфизма сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) на основе микросателлитных локусов одними исследователями [17] были выбраны 9 праймеров – psyl 17, psyl 42, psyl 44, lw_isotig21953, lw_isotig04306, lw_isotig27940, PtTx3107, PtTx4001, PtTx3116, а другими [6] – 9 других: lw_isotig04204, lw_isotig07383, lw_isotig10603, lw_isotig26230, lw_isotig00080, lw_isotig01420, lw_isotig04306, lw_isotig05123, lw_isotig11166, ctg4363.

Проведенный сравнительный анализ популяционно-генетических параметров *Pinus sylvestris* L. позволяет заключить, что 17 изученных микросателлитных локусов (см. табл. 1) подходят для генетических исследований и определения её генетической дифференциации, предоставляя важную информацию о внутривидовом разнообразии вида. Однако не исключено, что часть микросателлитных локусов, разработанных для *Pinus taeda* L., а также EST-SSR-локусы, изначально разработанные для оценки биологического разнообразия *P. sylvestris* var. *mongolica* могут проявлять себя как мономорфные или выявлять полиморфизм в количестве аллелей, что может быть обусловлено различиями в происхождении видов или особыми лесорастительными условиями, в которых находятся данные деревья.

Выводы

В ходе проведенного тестирования 14-ти EST-SSRs и 3-х nSSRs локусов была установлена высокая степень полиморфизма 17 SSR-молекулярных маркеров (lw_isotig04204, lw_isotig10603, lw_isotig17679, lw_isotig21953, lw_isotig27940, lw_isotig00080, lw_isotig00081, lw_isotig01420, lw_isotig04195, lw_isotig04306, lw_isotig05123, lw_isotig20215 PtTx4011, PtTx3107, PtTx4001, SPAC 12.5). На основании экспериментальных данных показано, что наиболее полиморфными в обеих популяциях были локусы lw_isotig21953, lw_isotig27940, lw_isotig20215, PtTx4001, SPAC 12.5. Количество выявленных аллелей по этим локусам варьировало от 12 до 6. Наименее информативным в наших исследованиях оказались lw_isotig02842 и lw_isotig07383. Несмотря на то, что один из них lw_isotig02842, отнесённый к типу EST-SSR, при оценке генетического полиморфизма у *Pinus sylvestris* L. оказался мономорфным в одной из популяций, мы считаем, что он может быть полезен при смене географического района.

Установлено, что деревья сосны обыкновенной в клоновых архивах Ульяновской области отличались более высоким генетическим разнообразием, в том числе и аллельным, по сравнению с лесными культурами из

Воронежской области, произрастающими в пессимальных для вида условиях. С этой точки зрения использование 17 16 SSR-молекулярных маркеров может быть полезным при определении генетического разнообразия популяций, выявления и отражения направленности адаптационного потенциала, и в целом для установления популяционной структуры сосны обыкновенной в разных регионах на территории России.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белоконь, М.М. Разработка микросателлитных маркеров сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по результатам полногеномного *de novo* секвенирования / М.М. Белоконь, Д.В. Политов, Е.А. Мудрик Т.А. Полякова, А.В. Шатохина, Ю.С. Белоконь, Н.В. Орешкова, Ю.А. Путинцева, В.В. Шаров, Д.А. Кузьмин, К.В. Крутовский // Генетика. – 2016. – Т. 52, № 12. – С. 1418–1427.
2. Гермак, М.В. Микросателлитный анализ для оценки дифференциации популяций ели европейской на Северо-Западе России / М.В. Гермак, Г.В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2019. – № 1. – С. 4–14.
3. Гладков, Ю.Ф. Генетический полиморфизм деревьев сосны обыкновенной из смежных болотной и суходольной ценопопуляций по ядерным микросателлитным локусам / Ю.Ф. Гладков, О.В. Шейкина // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2019. – № 4 (44). – С. 70–79.
4. Ильинов, А.А. Состояние генофонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии / А.А. Ильинов, Б.В. Раевский // Сибирский лесной журнал. – 2016. – № 5. – С. 45–54.
5. Калько, Г.В. Микросателлитные маркеры для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной / Г.В. Калько, Т.М. Котова // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2018. – № 3-4. – С. 17–30.
6. Калько, Г.В. Микросателлитный анализ природных и искусственных популяций *Pinus sylvestris* L. на Северо-Западе России / Г.В. Калько, Т.М. Котова, М.В. Кузьмина // Современная лесная наука: проблемы и перспективы: Мат. межд. науч.-практ. конф., Воронеж, 20–22 декабря 2017 года. – Воронеж: Истоки, 2017. – С. 27–32.
7. Камалова, И.И. Сравнительный анализ популяционной генетической структуры исходных и возобновившихся насаждений сосны обыкновенной из среднетаежной зоны европейской части России на основе изоферментного анализа / И.И. Камалова // Генетика и селекция – на службе лесу: Мат. межд. науч.-практ. конф, Воронеж, 29 июня 1996 года. – Воронеж: Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, 1997. – С. 12–16.
8. Крутовский, К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве / К.В. Крутовский // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 11–15.
9. Крутовский, К.В. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями / К.В. Крутовский, Д.В. Политов, Ю.П. Алтухов, Л.И. Милютин, Г.В. Кузнецова, А.И. Ирошников, В.Н. Воробьев, Н.А. Воробьева // Генетика. – 1989. – Т. 25, № 11. – С. 2009–2032.
10. Милютин, Л.И. Развитие лесной генетики в России / Л.И. Милютин, Е.Н. Муратова, А.Я. Ларионова // Сибирский лесной журнал. – 2018. – № 1. – С. 3–15.
11. Орешкова, Н.В. Разработка микросателлитных маркеров лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования / Н.В. Орешкова, Ю.А. Путинцева, В.В. Шаров, Д.А. Кузьмин, К.В. Крутовский // Генетика. – 2017. – Т. 53, № 11. – С. 1278–1284.

12. Петюренко, М.Ю. Экстракция суммарной ДНК из *Pinus sylvestris* L. при оценке полиморфизма – с использованием SSR- и RAPD-маркеров / М.Ю. Петюренко, И.И. Камалова, А.П. Сердюкова // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2021. – № 3. – С. 13–25.

13. Политов, Д.В. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов / Д.В. Политов, К.В. Крутовский, Ю.П. Алтухов // Генетика. – 1992. – Т. 28, № 1. – С. 93–114.

14. Санников, С.Н. Дифференциация популяций сосны обыкновенной / С.Н. Санников, И.В. Петрова. – Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2003. – 174 с.

15. Семериков, В.Л. Разработка новых маркеров митохондриальной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) для популяционно-генетических и филогеографических исследований / В.Л. Семериков, Ю.А. Путинцева, Н.В. Орешкова, С.А. Семерикова, К.В. Крутовский // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 12. – С. 1386–1391.

16. Семерикова, С.А. Сниженная изменчивость и высокая дифференциация маргинальных реликтовых популяций *Pinus brutia* Ten. в Крымско-Кавказском регионе / С.А. Семерикова, Н.В. Семериков // Экология. – 2020. – № 1. – С. 25–35.

17. Торбик, Д.Н. Генетическое разнообразие естественных популяций *Pinus sylvestris* L. / Д.Н. Торбик, Т.В. Бедрицкая, М.М. Власова, И.Г. Синельников // Наука – лесному хозяйству Севера : Сборник научных трудов ФБУ «Северный научно-исследовательский институт лесного хозяйства» / Отв. ред.: Н.А. Демидова. – Архангельск: ФБУ «Северный научно-исследовательский институт лесного хозяйства», 2019. – С. 91–99.

18. Auckland, L., Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland, T. Bui, Y. Zhou, M. Shepherd, C. Williams. – Texas : A&M University, College Station, 2002. – 57 p.

19. Elsik, C.G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. / C.G. Elsik, V.T. Minihan, S.E. Hall, A.M. Scarpa, C. Williams // Genome. – 2000. – № 43 (3). – P. 550–555.

20. Fang, P. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*) / P. Fang, S. Niu, H. Yuan, Z. Li, Y. Zhang, L. Yuan,W. Li // Applications in Plant Sciences. – 2014. – № 2. – P. 1–6.

21. Kalko, G. Real-Time PCR and analysis of amplicon melting curves to assess the suitability of SSR loci of Scots pine for multiplexing / G. Kalko, T. Kotova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science : International Scientific and Practical Conference “Forest Ecosystems as Global Resource of the Biosphere: Calls, Threats, Solutions”, Voronezh: Institute of Physics Publishing, 2019. – P. 012015.

22. Liewlaksaneeyanawin, Ch. Single-copy, speciestransferable microsatellite markers developed from Loblolly Pine ESTs / Ch. Liewlaksaneeyanawin, C.E. Ritland, Y.A. El-Kassaby, K. Ritlan // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – № 109. – P. 361–369.

23. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular ecology notes. – 2006. – № 6 (1). – P. 288–295.

24. Serdyukova, A.P. The state of *Scots pine* plantations in the steppe Voronezh region in drought conditions and under anthropogenic influence / A.P. Serdyukova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (vol. 817). – IOP Publishing Ltd., 2021. – P. 012098.

25. Soranzo, N. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // Molecular Ecology. – 1998. – № 7 (9). – P. 1260–1261.

26. Unger, G.M. Estimating exotic gene flow into native pine stands: zygotic vs. gametic components / G.M. Unger, J.J. Robledo-Arnuncio, G.G. Vendramin // Molecular Ecology. – 2014. – Vol. 23, № 22. – P. 5435–-5447.

27. Zhou, Y. Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome / Y. Zhou, T. Bui, L.D. Auckland, C.G. Williams // Genome. – 2002. – № 45. – P. 91–99.

REFERENCES

1. Belokon' M.M., Politov D.V., Mudrik E.A., Polyakova T.A., Shatoxina A.V., Belokon Yu.S., Oreshkova N.V., Putintseva Yu.A., Sharov V.V., Kuzmin D.A., Krutovsky K.V. Razrabotka mikrosatellitnyh markerov sosny kedrovoj sibirskoj (*Pinus sibirica* Du Tour) po rezul'tatam polnogenomnogo *de novo* sekvenirovaniya. *Genetika*, 2016, vol. 52, no. 12, pp. 1418–1427. (In Russian)
2. Germak M.V., Kal'ko G.V. Mikrosatellitnyj analiz dlya ocenki differenciacii populyacij eli evropejskoj na Severo-Zapade Rossii. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo xozyaystva*, 2019, no. 1, pp. 4–14. (In Russian)
3. Gladkov Yu.F., Sheikina O.V. Geneticheskiy polimorfizm derev'yev sosny obyknovennoy iz prilegayushchix bolotnoy i suxodol'noy tsenopopulyatsiy po yadernym mikrosatellitnym lokusam. *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo texnologicheskogo universiteta. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopol'zovaniye*, 2019, no. 4, vol. 44, pp. 70–79. (In Russian)
4. Ilyinov A.A., Raevsky B.V. Sostoyaniye genofonda sosny obyknovennoy *Pinus sylvestris* L. v Karelii. *Sibirskiy lesnoy zhurnal*, 2016, no. 5, pp. 45–54. (In Russian)
5. Kal'ko G.V., Kotova T.M. Mikrosatellitnyye markery dlya otsenki geneticheskogo raznoobraziya sosny obyknovennoy. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo xozyaystva*, 2018, no. 3, pp. 17–30. (In Russian)
6. Kal'ko G.V., Kotova T.M., Kuzmina M.V. Mikrosatellitnyy analiz prirodnyx i iskusstvennyx populyatsiy Pinus sylvestris L. na Severo-Zapade Rossii. *Lesnaya nauka: problemy i perspektivy, Mat. Vseros. nauch.-prakt. konf.* Voronezh, 2017, pp. 27–32. (In Russian)
7. Kamalova I.I. Sravnitel'nyy analiz populyatsionnoy geneticheskoy struktury isxodnyx i vozobnovlennyx nasazhdeniy sosny obyknovennoy iz srednetayezhnoy zony yevropeyskoy chasti Rossii na osnove izofermentnogo analiza. *Mat. mezhd. nauch.-prakt. konf.: Genetika i selektsiya - na sluzhbe lesu*. Voronezh, 1997, pp. 12–6 (In Russian)
8. Krutovskiy K.V. Perspektivy ispol'zovaniya genomnyx issledovaniy v lesnom xozyaystve. *Sibirskiy lesnoy zhurnal*, 2014, vol. 4, pp. 11–15. (In Russian)
9. Krutovsky K.V., Politov D.V., Altuxov Yu.P. Milyutin L.I., Kuznecova G.V., Iroshnikov A.I., Vorob'ev V.N., Vorob'eva N.A. Geneticheskaya izmenchivost' sibirskoy kedrovoy sosny *Pinus sibirica* Du Tour. Soobshcheniye IV. Geneticheskoye raznoobraziye i stepen' geneticheskoy differentsiatsii mezhdu populyatsiyami. *Genetika*, 1989, vol. 25, no. 11, pp. 2009–2032. (In Russian)
10. Milyutin L.I., Muratova Ye.N., Larionova A.Ya. Razvitiye lesnoy genetiki v Rossii. *Sibirskiy lesnoy zhurnal*, 2018, no. 1, pp. 3–15. (In Russian)
11. Oreshkova N.V., Putintseva Y.A., Sharov V.V., Kuzmin D.A., Krutovsky K.V. Razrabotka mikrosatellitnyx markerov listvennitsy sibirskoy (*Larix sibirica* Ledeb.) na osnove polnogenomnogo sekvenirovaniya *de novo*. *Genetika*, 2017, vol. 53, no. 11, pp. 1194–1199. (In Russian)
12. Peturenko M.Ju., Kamalova I.I., Serdyukova A.P. Ekstraktsiya summarnoy DNK iz *Pinus sylvestris* L. pri otsenke polimorfizma s ispol'zovaniyem SSR- i RAPD-markerov. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo xozyaystva*, 2021, no. 3, pp. 13–25. (In Russian)
13. Politov D.V., Krutovsky K.V., Altuxov Yu.P. Xarakteristika genofondov populyatsiy kedra sibirskogo po sovokupnosti izofermentnyye lokusy. *Genetika*, 1992, vol. 28, pp. 93–114. (In Russian)
14. Sannikov S.N., Petrova I.V. Differentsiatsiya populyatsiy sosny obyknovennoy. Yekaterinburg, 2003, 247 p. (In Russian)

15. Semerikov V.L., Semerikova S.A., Putintseva Y.A., Oreshkova N.V., Krutovsky K.V. Razrabotka novyx markerov mitoxondrial'noy DNK sosny obyknovennoy (*Pinus sylvestris* L.) dlya populyatsionno-geneticheskix i filogeograficheskix issledovaniy. *Genetika*, 2015, vol. 51, no. 12, pp. 1199–1203. (In Russian)
16. Semerikova S.A., Semerikov N.V. Snizhennaya izmenchivost' i vysokaya differentsiatsiya marginal'nyx reliktovyx populyatsiy *Pinus brutia* Ten. v Krymsko-Kavkazskom predpriyatii. *Ekologiya*, 2020, no. 1, pp. 25–35. (In Russian)
17. Torbik D.N., Bedritskaya T.V., Vlasova M.M., Sinelnikov I.G. Geneticheskoye raznoobraziye sovokupnosti populyatsii P*inus sylvestris. Nauka – lesnomu xozyaystvu Severa: Sbornik nauchnyx trudov*. Arxangelsk, Northern Research Institute of Forestry, 2019. pp. 91–99. (In Russian)
18. Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. Conifer Microsatellite Handbook. Texas: A&M University, College Station, 2002. – 57 p.
19. Elsik C.G., Minihan V.T., Hall S.E., Scarpa A.M., Williams C. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*, 2000, vol. 43, pp. 550–555.
20. Fang P., Niu S., Yuan H., Li Z., Zhang Y., Yuan L., Li W. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*). *Applications in Plant Sciences*, 2014, no. 2, pp. 1–6.
21. Kalko G., Kotova T. Real-time PCR and analysis of amplicon melting curves to assess the suitability of SSR loci of *Scots pine* for multiplexing. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (vol. 392)*. Voronezh, 2019, p. 012015.
22. Liewlaksaneeyanawin Ch., Ritland C.E., El-Kassaby Y.A., Ritlan K. Single-copy, speciestransferable microsatellite markers developed from Loblolly Pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, no. 109, pp. 361–369.
23. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 2006, no. 6 (1), pp. 288–295.
24. Serdyukova A.P. The state of Scots Pine plantations in the steppe Voronezh region in drought conditions and under anthropogenic influence. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (vol. 817). Orenburg, 2021, pp. 012098.
25. Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*,1998, no. 7 (9), pp. 1260–1261.
26. Unger G.M., Vendramin G.G., Robledo-Arnuncio J.J. Estimating exotic gene flow into native pine stands:zygotic vs. gametic components. *Molecular Ecology*, 2014, no. 23, pp. 5435–5447.
27. Zhou Y., Bui T., Auckland L.D., Williams C.G. Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome. *Genome*, 2002, no. 45, pp. 91–99.

Статья поступила в редакцию 19.09.2022