



DOI 10.21178/2079–6080.2022.3.4  
УДК 575.174.015.3:582.475

## Изменчивость показателей молекулярных маркеров у клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L.

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

---

### Variability of indicators of molecular markers in clones of plus trees *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 studying the genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plus trees in 3 populations of the Ulyanovsk region for 14 EST-SSRs and 3 nSSRs -loci. The studied populations originated from the Kuzovatovsky, Nikolaevsky and Mainsky forestries located on the territory of the administrative districts of the same name. SSR loci were analyzed using the GenAEx program for expected ( $H_e$ ) and observed heterozygosity ( $H_o$ ), average number of alleles per locus ( $N_a$ ), number of effective alleles ( $N_e$ ), and polymorphism. As a result of the microsatellite analysis, it was revealed that one of the *lw\_isotig02842* loci, assigned to the EST-SSR type, did not reveal polymorphism between plus trees in the Kuzovatovskaya and Nikolaevsky populations and was monomorphic. Based on the variability by SSRs -loci, estimates of genetic variability in the studied populations of *Pinus sylvestris* L were given. The results of the study show that the population from the Mainsky forestry was characterized by the maximum values of most parameters of genetic variability:  $N_a = 4,353$ ,  $N_e = 3,274$ ,  $H_e = 0,651$ . At the same time, in all 3 *Pinus sylvestris* L. populations of the Ulyanovsk region, higher values of expected heterozygosity were found compared to the observed one, which indicates a deficit of heterozygotes. An analysis of the population structure using F-statistics showed that 87,9 % of the total genetic diversity is concentrated within populations, while about 12,1 % of all observed variability is accounted for by interpopulation. The most significant differences in the genetic structure for 17 SSR loci are observed between the pine populations growing in the Mainskoye and Nikolaevskoye forestries ( $D_N = 0,548$ ), while the least differentiated from each other according to the microsatellite analysis of the population from the Kuzovatovsky and Nikolaevskoye forestries ( $D_{N=0,159}$ ).

**Keywords:** *Pinus sylvestris* L., genetic structure, genetic diversity, populations, plus trees, SSR-markers, F-statistics

**Изменчивость показателей молекулярных маркеров у клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L.**

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

В статье представлены результаты изучения генетической изменчивости плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в 3 популяциях Ульяновской области по 14 EST-SSRs и 3 nSSRs локусам. Исследованные популяции происходили из Кузоватовского, Николаевского и Майнского лесничеств, расположенных на территории одноименных административных районов. SSR-локусы были проанализированы с помощью программы GenAlEx для определения ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности, среднего количества аллелей на локус ( $N_a$ ), числа эффективных аллелей ( $N_e$ ), полиморфности. В результате проведенного микросателлитного анализа выявлено, что один из локусов lw\_isotig02842, отнесенный к типу EST-SSR не выявил полиморфизма между плюсовыми деревьями в Кузоватовской и Николаевской популяциях и был мономорфный. На основе изменчивости по SSRs-локусам даны оценки показателей генетической изменчивости в исследованных популяциях *Pinus sylvestris* L. Результаты исследования показывают, что популяция из Майнского лесничества характеризовалась максимальными значениями большинства параметров генетической изменчивости:  $N_a = 4,353$ ,  $N_e = 3,274$ ,  $H_e = 0,651$ . В то же время во всех 3 популяциях сосны на территории Ульяновской области выявлены более высокие значения ожидаемой гетерозиготности по сравнению с наблюдаемой, что свидетельствует о дефиците гетерозигот. Анализ популяционной структуры с помощью статистик Райта показал, что внутри популяций сосредоточено 87,9 % всего генетического разнообразия, в то время как около 12,1 % от всей наблюдаемой изменчивости приходится на межпопуляционную. Наиболее значительные различия в генетической структуре по 17 SSR-локусам выявлены между популяциями сосны, произрастающими в Николаевском и Майнском лесничествах ( $D_N = 0,548$ ), в то время как минимально дифференцированы друг от друга по данным микросателлитного анализа популяции из Кузоватовского и Николаевского лесничеств ( $D_N = 0,159$ ).

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris* L., генетическая структура, генетическое разнообразие, популяции, плюсовые деревья, SSR-маркеры, индекс фиксации Райта

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 настоящее время для сохранения и изучения внутривидового генетического разнообразия лесных древесных видов с успехом используют информативные ДНК-маркеры, с помощью которых могут быть рассчитаны генетико-статистические параметры, используемые для последующего применения в селекционных программах и мероприятиях по сохранению генофонда основных лесообразующих пород Российской Федерации. Генетические маркеры внесли большой вклад в понимание генетического дрейфа, потока генов, уровня генетической, системы скрещивания в лесных популяциях. Их использование находит также применение для проверки различных гипотез о миграции видов, связанной с изменением климатических условий, определения видов, обнаружения мутаций и в целом для оценки селекционных программ. Их эффективность объясняется также тем, что традиционные методы изучения адаптивной генетической изменчивости лесных древесных видов, такие как, например, географические культуры, очень затратные и основаны исключительно на фенотипическом анализе. Зачастую эти признаки, отнесенные к количественным параметрам, зависят от условий окружающей среды и могут иметь низкий коэффициент наследуемости, требуют долговременных полевых испытаний, и поэтому на их основе не всегда удавалось выявить точную генотипическую структуру, а также получать данные о генетических процессах, протекающих в природных популяциях [7]. Это связано, как правило, с тем, что проявление наследственных свойств потомств зависит от экологических условий произрастания, сложившихся в данный временной промежуток, т. е. обусловлено взаимодействием «генотип-среда».

Ранее российскими и зарубежными учеными широко проводились молекулярно-генетические исследования с помощью изоферментных маркеров генов, характеризующих белковый полиморфизм, что отражено в обширном материале о структуре и генетиче-

ском разнообразии популяций сосны обыкновенной [8–10]. За десятилетия использования в лесной генетике аллозимный анализ показал себя как объективный метод оценки внутривидовой генетической изменчивости, позволяющий выявлять гомо- и гетерозиготность особи, идентифицировать генотипы, определять материнский и отцовский вклад в потомство. Однако эти маркеры обнаруживают только те замены аминокислот, которые приводят к изменению заряда белковой молекулы – это около трети всех мутационных замен. При этом, характеризуя вариабельность в основном ферментных локусов, расположенных в ядре клетки, аллозимные маркеры описывают изменчивость только части ядерного генома. В результате зачастую не ясно, является ли обнаруживаемая ими изменчивость селективно нейтральной или имеет адаптивное значение. Конечно, ни один традиционный маркер не может соответствовать всем критериям адаптивной изменчивости, тем не менее одними из перспективных геномных маркеров в лесной генетике являются высокополиморфные полиаллельные микросателлитные локусы, имеющие кодоминантное наследование – SSR (Simple Sequence Repeat), в том числе EST-локусы, представляющие собой частичные или полные нуклеотидные последовательности экспрессируемых генов. Многочисленными работами российских исследователей была показана их эффективность при оценке генетического разнообразия хвойных [1–6].

Целью данной работы явилось изучение на основе использования микросателлитных локусов генетического разнообразия и популяционной структуры клонов плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в Кузоватовском, Майнском и Николаевском лесничествах Ульяновской области.

## Материалы и методы исследований

*Отбор вегетативного материала для исследований.* Отбор образцов хвои проводился

в клоновых архивах плюсовых деревьев сосны обыкновенной, расположенных в Ульяновской области на территории Кузоватовского лесничества. Площадь изученных клоновых архивов составила 2,2 га, возраст рамет клонов – 42 года. Исследованные клоны плюсовых деревьев происходили из Кузоватовского, Николаевского и Майнского лесничеств, расположенных на территории одноименных административных районов. Поскольку достоверных корреляций между количественными признаками, по которым отбирались плюсовые деревья, и показателями молекулярных маркеров не установлено [данные не представлены], то характеристики изученных выборок клонов плюсовых деревьев можно распространять на приспевающие и спелые насаждения сосны обыкновенной 3 популяций: Кузоватовской (pop1), Николаевской (pop2), Майнской (pop3). Общее количество клонов плюсовых деревьев, отобранных для исследования составило 45.

**Выделение суммарной ДНК из хвои *Pinus sylvestris* L.** Выделение суммарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из хвои *Pinus sylvestris* L. проводили с использованием набора diaGene (Диаэм) для растительной ткани по существующей методике [11].

**Количественное определение нуклеиновых кислот.** Количественное определение содержания ДНК в исследуемых образцах выполняли на приборе Qubit 2.0 (Life Technologies) с использованием реагентов Qubit™ dsDNA BR AssayKit согласно инструкции производителя.

**Полимеразная цепная реакция.** Для проведения реакции использовали готовую смесь для ПЦР ScreenMix-HS (Евроген, Россия). При постановке реакции ПЦР в смесь добавляли прямой и обратный праймер по 0,2–0,4 мкМ каждого, матрицу ДНК до 50 нг на реакцию и стерильную воду – до конечного объема 25 мкл. При выполнении работы нами были проанализированы микросателлитные (SSR) маркеры, созданные с использованием геномных библиотек для вида *Pinus sylvestris* L. [16], *Pinus taeda* L. [12, 13], а также EST-SSR-локусы, изначально разработанные для оценки биологического разнообразия *P. sylvestris* var. *mongolica*, произрастающей на территории Монголии, на основании 31653 EST-последовательностей этого вида [14]. Основными критериями для отбора микросателлитных локусов служили высокая степень информативности и полиморфности. По результатам литературного обзора для оценки генетической структуры *Pinus sylvestris* L. нами были выбраны 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, SPAC12.5.

Характеристика отобранных для исследования локусов приведена в таблице 1.

Таблица 1  
Характеристика микросателлитных локусов сосны, использованных в работе, по литературным данным

Локус	Мотив <sup>1</sup>	Размер фрагмента, п. н. <sup>2</sup>	Количество аллелей, N <sub>a</sub>	Ожидаемая гетерозиготность, H <sub>e</sub>	GenBank accession no. <sup>3</sup>
EST-SSRs					
lw_isotig04204	(CGGCT) <sub>5</sub>	230	2	0,345	KF501187
lw_isotig10603	(CAG) <sub>7</sub>	196	2	0,408	KF501191
lw_isotig17679	(TTAA) <sub>5</sub>	277	3	0,443	KF501192

Локус	Мотив <sup>1</sup>	Размер фрагмента, п. н. <sup>2</sup>	Количество аллелей, $N_a$	Ожидаемая гетерозиготность, $H_e$	GenBank accession no. <sup>3</sup>
lw_isotig21953	(ATGGG) <sub>7</sub>	208	7	0,782	KF501193
lw_isotig27940	(TGGA) <sub>5</sub>	231	3	0,557	KF501195
lw_isotig00080	(CCG) <sub>6</sub>	177	3	0,291	KF501196
lw_isotig00081	(CCG) <sub>6</sub>	290	3	0,227	KF501197
lw_isotig01420	(CTG) <sub>5</sub>	174	3	0,617	KF501198
lw_isotig04195	(GAG) <sub>5</sub>	189	4	0,422	KF501204
lw_isotig04306	(TCC) <sub>7</sub>	196	3	0,478	KF501205
lw_isotig05123	(GAG) <sub>6</sub>	166	2	0,360	KF501206
lw_isotig20215	(TA) <sub>7</sub>	186	8	0,737	KF501210
lw_isotig07383	(GAT) <sub>8</sub>	191	3	0,472	KF501190
lw_isotig02842	(AGA) <sub>5</sub>	229	2	0,378	KF501203
nSSRs					
PtTx4011	(CA) <sub>20</sub>	303	н/д	0,683	AF286621
PtTx4001	(GT) <sub>15</sub>	224	н/д	0,842	AF286619
SPAC12.5	(GT) <sub>20</sub> (GA) <sub>10</sub>	155	10	0,924	AJ223772

Примечания. 1) мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; 2) п. н. – пары нуклеотидов; 3) номер последовательности олигонуклеотидов в международной базе Genbank; н/д – нет данных в доступной литературе.

Процедуры амплификации проводили в соответствии с условиями, предложенными авторами, ранее работавшими с праймерами [12–15]. Результаты амплификации визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 3,5 % агарозе марки MS-12 в проходящем УФ свете при  $\lambda = 254$  нм. Размеры фрагментов амплифицированной ДНК определяли с использованием маркеров длин ДНК: 100 + bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Распознавание размера продуктов амплификации на электрофореграмме осуществлялось при помощи программного обеспечения «Labimage», version: 4.2.3 (<http://www.kapelanbio.com/>).

При определении основных популяционно-генетических характеристик использовали следующие параметры, применяемые при анализе кодоминантных маркеров:  $N_a$  – число аллелей на локус,  $N_e$  – эффективное число аллелей на локус,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  – ожидае-

мая гетерозиготность,  $P$  – полиморфность. 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. Для оценки уровня генетической структуры популяции использовали F-статистику Райта, или индексы фиксации, характеризующие индивидуальный ( $F_{IS}$ ), субпопуляционный ( $F_{ST}$ ) и популяционный ( $F_{IT}$ ) уровни генетической структуры популяции. Степень генетических различий между популяциями и возрастными группами определяли с помощью генетического расстояния Нея. Основные статистики оценивались по микросателлитным данным в программе GenAlEx6.503 [15].



### Результаты и их обсуждение

Для оценки генетической структуры изучаемых популяций были рассчитаны частоты встречаемости всех аллелей. Анализ генетического разнообразия популяций сосны обыкновенной показал, что все изученные локусы у *Pinus sylvestris* L. оказались полиморфными, за исключением локуса lw\_isotig02842, который в двух из трёх популяций оказался мономорфным. Количество редких аллелей (с частотой встречаемости  $< 0,05$ ) в популяциях варьировало от 2,7 % (Майнская популяция) до 8,3 % (Кузоватовская популяция). Усредненный показатель количества аллелей ( $N_a$ ) с частотой более 5 % составил для трёх проанализированных популяций 3,471, 2,941 и 3,765 соответственно.

Аmplификация 17 SSR-локусов позволила выявить в первой популяции – 36, во второй – 32, в третьей – 36 аллельных вариантов. Количество и размер аллелей изучаемых локусов менялись в зависимости от популяции в клоновых архивах. Так, в первой и второй популяциях наименее изменчивым оказался локус lw\_isotig02842, выявивший 1 аллель, наиболее полиморфным – локус lw\_isotig21953, имеющий от 6 до 11 аллельных вариантов. Ряд аллелей встречались только в одной из популяций, т. е. были для них специфичными. Так, например, аллель ориентировочно 170 п. н. локуса lw\_isotig04306 обнаружен только в первой популяции, а аллель размером ориентировочно 190, 195, 200 п. н. этого же локуса – только в третьей популяции. В то

же время по таким локусам, как lw\_isotig01420, lw\_isotig10603, lw\_isotig20215, lw\_isotig17679, lw\_isotig04195, lw\_isotig02842, lw\_isotig00081, SPAC12.5, PtTx4011 также выявлены различия в частотах некоторых аллелей между отдельными популяциями.

В исследованном нами насаждении было выявлено наличие широкого спектра полиморфизма среди изучаемых локусов. Наибольший уровень наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) в Кузоватовской популяции показан для 5 EST-SSRs-локусов – lw\_isotig10603, lw\_isotig17679, lw\_isotig04204, lw\_isotig00081, lw\_isotig21953, что составило соответственно 0,364; 0,929; 0,786; 0,929 и 0,643. Схожие значения показателя  $H_o$  были отмечены также для Николаевской и Майнской популяций сосны (за исключением локуса lw\_isotig10603, который не выявил гетерозигот по этому локусу в выборке из третьей популяции).

Показатель ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) варьировал в популяциях – от 0 до 0,832 (локус lw\_isotig02842 и lw\_isotig21953 соответственно) для Кузоватовской популяции, от 0 до 0,766 (локус lw\_isotig02842 и lw\_isotig21953 соответственно) для Николаевской популяции, и от 0 до 0,957 (локус lw\_isotig02842 и lw\_isotig00081 соответственно) в Майнской популяции.

Параметры генетической изменчивости клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L., полученные с помощью микросателлитных локусов, приведены в таблице 2.

Таблица 2

Усредненные параметры генетической изменчивости популяций плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L., произрастающих в Ульяновской области, по 17 SSR-маркерам

Параметры генетической изменчивости	Кузоватовская популяция	Николаевская популяция	Майнская популяция
P, %	94,12	94,12	100,0
$N_a \pm SE$	$3,882 \pm 0,506$	$2,941 \pm 0,303$	$4,353 \pm 0,507$
$N_e \pm SE$	$2,967 \pm 0,311$	$2,418 \pm 0,198$	$3,274 \pm 0,323$
$H_o \pm SE$	$0,236 \pm 0,086$	$0,213 \pm 0,079$	$0,194 \pm 0,079$
$H_e \pm SE$	$0,596 \pm 0,047$	$0,537 \pm 0,043$	$0,651 \pm 0,030$

Параметры генетической изменчивости	Кузоватовская популяция	Николаевская популяция	Майнская популяция
$F \pm SE$	$0,585 \pm 0,152$	$0,591 \pm 0,152$	$0,675 \pm 0,137$

Примечание.  $N_a$  – среднее число аллелей на локус,  $N_e$  – эффективное число аллелей на локус,  $H_o$  и  $H_e$  – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности,  $F$  – индекс фиксации Райта.

Согласно полученным данным, доля полиморфных локусов в клоновых архивах варьировала от 94,12 % до 100 %. Наблюдаемые различия в показателях полиморфности связаны с разной мономорфностью локусов. Так, все ядерные локусы в исследовании оказались полиморфными, в то время как один из локусов *lw\_isotig02842*, отнесённый к типу EST-SSR при оценке генетического полиморфизма в двух выборках из трёх оказался мономорфным.

В ходе анализа генетической изменчивости изучаемых популяций минимальные значения по всем основным параметрам, за исключением наблюдаемой гетерозиготности ( $N_a = 2,941$ ;  $N_e = 2,418$ ;  $H_e = 0,537$ ) были выявлены для Николаевской популяции. Из приведенных данных следует, что по SSR-маркерам более изменчивой относительно

других является Майнская популяция. Числовое значение параметра среднего числа аллелей на локус составило 4,353,  $H_o$  и  $H_e$  – 0,194 и 0,651 соответственно.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности во всех изученных популяциях сосны обыкновенной оказался ниже ожидаемого, индекс фиксации Райта  $F$  оказался положительным, что свидетельствует о дефиците гетерозигот ( $F = 0,585$ ,  $F = 0,591$ ,  $F = 0,675$  соответственно).

О недостатке гетерозигот в исследованных нами популяциях сосны свидетельствуют и показатели  $F$ -статистики Райта (табл. 3). Анализ структуры генетической изменчивости с помощью индексов фиксации показал, что каждое дерево в выборке имеет 63,4%-ный недостаток гетерозигот в популяции ( $F_{is} = 0,634$ ) и 65,5%-ный дефицит относительно вида ( $F_{it} = 0,655$ ).

Таблица 3

Индексы фиксации Райта ( $F_{is}$ ,  $F_{it}$  и  $F_{st}$ ) для 17 SSR-локусов популяций плюсовых деревьев сосны обыкновенной

Локус	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$
<i>lw_isotig04306</i>	0,827	0,860	0,190
<i>lw_isotig01420</i>	1,000	1,000	0,149
<i>lw_isotig27940</i>	0,968	0,970	0,058
<i>lw_isotig10603</i>	0,591	0,636	0,109
<i>lw_isotig07383</i>	1,000	1,000	0,048
<i>lw_isotig20215</i>	1,000	1,000	0,123
<i>lw_isotig05123</i>	1,000	1,000	0,157
<i>lw_isotig17679</i>	-0,465	-0,322	0,098
<i>lw_isotig00080</i>	0,941	0,943	0,048
<i>lw_isotig04195</i>	1,000	1,000	0,170
<i>lw_isotig04204</i>	-0,408	-0,406	0,001
<i>lw_isotig02842</i>	1,000	1,000	0,367
<i>lw_isotig00081</i>	-0,693	-0,655	0,022

Локус	$F_{is}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
lw_isotig21953	0,285	0,333	0,067
SPAC 12.5	0,925	0,929	0,053
PtTx4001	0,909	0,922	0,140
PtTx4011	0,898	0,925	0,258
Среднее	0,634	0,655	0,121
SE	0,142	0,136	0,022

Примечание.  $F_{is}$  – индекс фиксации особи относительно популяции;  $F_{IT}$  – индекс фиксации особи относительно вида;  $F_{ST}$  – индекс фиксации популяции относительно вида.

Наибольший дефицит гетерозигот для проанализированных популяций в зависимости от выборки был выявлен у локусов lw\_isotig01420, lw\_isotig07383, lw\_isotig20215, lw\_isotig05123, lw\_isotig00080, lw\_isotig04195, lw\_isotig04306, lw\_isotig10603, lw\_isotig27940, SPAC12.5, PtTx4011, PtTx4001 (числовое значение индекса фиксации Райта близко к единице).

Напротив, для трёх локусов – lw\_isotig17679, lw\_isotig04204 и lw\_isotig00081 в Николаевской и Майнской популяциях наблюдался значительный избыток гетерозигот: показатель  $F$  в первом случае составил -0,439, -0,647, -0,677 соответственно, во втором – -0,684, -0,600, -0,455 соответственно.

Степень подразделённости популяций, оцениваемая по индексу фиксации популяции относительно вида ( $F_{ST}$ ), по разным локусам варьирует от 0,001 до 0,367 и в среднем составляет 0,121. Это говорит о том, что около 87,9 % всей генетической изменчивости находится внутри популяций, а на долю межпопуляционной изменчивости приходится 12,1 %. Стоит особо отметить, что,

как правило, у хвойных установлена весьма небольшая межпопуляционная генетическая изменчивость (2–5 %) и наоборот, – высокий уровень внутривидовой изменчивости (95–98 %) [9]. В нашем исследовании процент межпопуляционной изменчивости достаточно велик, что может говорить о значительном уровне межпопуляционной дифференциации в исследованной части ареала плюсовых деревьев в клонных архивах. Результат AMOVA-анализа также показал, что большая часть общей генетической дисперсии, обнаруженной на основе исследования 17 микросателлитных локусов сосны обыкновенной, приходится на изменчивость внутри популяций 85 %, межпопуляционная доля составляет 15 %.

Используя коэффициенты генетической дистанции Нея ( $D_N$ ), была проведена количественная оценка степени близости между исследованными популяциями сосны обыкновенной на основании генетических расстояний, рассчитанных по частотам аллелей 17 ядерных микросателлитных локусов. Вычисленные значения коэффициентов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Генетические дистанции  $D_N$  между тремя изученными популяциями *Pinus sylvestris* L.

pop1	pop2	pop3	
0,000	-	-	pop1
0,159	0,000	-	pop2
0,427	0,548	0,000	pop3

Генетическое расстояние  $D_N$  между популяциями варьирует от 0,159 до 0,548, со-



ставляя в среднем 0,378. Наиболее значительные различия в генетической структуре по 17 SSR-локусам наблюдаются между Николаевской и Майнской популяцией сосны ( $D_N = 0,548$ ). Минимально дифференцированы друг от друга Кузоватовская и Николаевская популяции ( $D_N = 0,159$ ).

В целом, если сравнить полученные показатели изменчивости показателей молекулярных маркеров проанализированных популяций на основе микросателлитного анализа, то следует отметить, что Майнская популяция характеризуется более высоким уровнем генетического полиморфизма в сравнении с двумя другими и обладает теоретически большим потенциалом для адаптации к лесорастительным условиям. Однако для такого заключения необходимо продолжить изучения популяционной структуры сосны обыкновенной в данном регионе и увеличить выборку деревьев.

#### Заключение

Анализ генетической структуры популяций сосны, произрастающих в Ульяновской области на территории Кузоватовского лесничества, показал, что один из локусов – *lw\_isotig02842*, отнесённый к типу EST-SSR, не выявил полиморфизма между плюсовыми деревьями в двух из трёх популяциях и был мономорфным. Несмотря на это, мы считаем, что он может быть полезен при смене географического района. Результаты популяцион-

но-генетического анализа, проведенного с помощью 17 SSR-локусов, позволили получить оценки уровня генетического разнообразия и дифференциации трёх популяций *Pinus sylvestris* L. из разных лесничеств Ульяновской области. Выявлено, что Майнская популяция продемонстрировала наиболее высокое аллельное разнообразие ( $N_a = 4,353$ ;  $N_c = 3,274$ ). В результате изучения особенностей генетического разнообразия во всех популяциях обнаружен более высокий уровень ожидаемой гетерозиготности по сравнению с наблюдаемой, что, возможно, является следствием самоопыления в популяциях сосны, где были отобраны плюсовые деревья. AMOVA-анализ показал, что большая часть общей генетической дисперсии, обнаруженной на основе исследования микросателлитных локусов, приходится на изменчивость внутри популяций, межпопуляционная доля составляет 12,1 %. Результаты вычислений генетических дистанций по Неи показали обособленность между Николаевской и Майнской популяцией сосны ( $D_N = 0,548$ ).

Полученные данные по изменчивости показателей молекулярных маркеров у клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. могут быть использованы в дальнейшем для обоснования долгосрочных программ неистощительного пользования лесными биологическими ресурсами и воспроизводства их генофондов при выполнении селекционных и лесовосстановительных мероприятий.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Демкович, А.Е. Генетическая изменчивость плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. и их семенного потомства по микросателлитным локусам / А.Е. Демкович, И.И. Коршиков, Д.В. Политов, Е.А. Мудрик, С.А. Лось // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 5. – С. 395–405.
2. Ильинов, А.А. Использование микросателлитных локусов в изучении плюсового генофонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии / А.А. Ильинов, Б.В. Раевский // Труды Карельского научного центра РАН. – 2018. – № 6. – С. 124–134.
3. Ильинов, А.А. Состояние генофондов основных лесобразующих видов водосбора Белого моря (на примере *Picea × fennica* (Regel) kom. и *Pinus sylvestris* L.) / А.А. Ильинов, Б.В. Раевский, О.В. Чирва // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18, № 2. – С. 185–202.

4. 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 : Материалы Всероссийской научн.-практ. конф. 20–22 декабря 2017 года. – Воронеж : Истоки, 2017. – С. 27–32.
5. Калько, Г.В. Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной / Г.В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2017. – № 1. – С. 23–34.
6. Камалова, И.И. Изменчивость микросателлитных локусов у *Pinus sylvestris* L. из степной зоны центральной России / И.И. Камалова, М.Ю. Петюренко, А.П. Сердюкова // Лесные экосистемы: современные вызовы, состояние, продуктивность и устойчивость : Мат. между. науч.-практ. конф. посвященной 90-летию Института леса НАН Беларуси (Гомель, 13–15 ноября 2020 г.) / Институт леса НАН Беларуси ; редкол.: А.И. Ковалевич [и др.]. – Гомель : Институт леса НАН Беларуси, 2020. – С. 42–47.
7. Крутовский, К.В. От популяционной генетики к популяционной геномике лесных древесных видов: интегрированный популяционно-геномный подход / К.В. Крутовский // Генетика – 2006. – Т. 42, № 10. – С. 1088–1100.
8. Тараканов, В.В. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты / В.В. Тараканов, М.М. Паленова, О.В. Паркина, Р.В. Роговцев, Р.А. Третьякова // Лесохозяйственная информация. – 2021. – № 1. – С. 100–143.
9. Санников, С.Н. Дифференциация популяций сосны обыкновенной / С.Н. Санников, И.В. Петрова. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2003. – 247 с.
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. 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.
12. Auckland, L., Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland, T. Bui, Y. Zhou, M. Shepherd, C. Williams – Texas : A&M University, College Station, 2002. – 57 p.
13. Elsiik, C.G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. / C.G. Elsiik, V.T. Minihan, S.E. Hall, A.M. Scarpa, C. Williams // Genome. – 2000. – vol. 43. – pp. 550–555.
14. 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. – pp. 1–6.
15. 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). – pp. 288–295.
16. Soranzo, N. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // Molecular Ecology. – 1998. – № 7 (9). – pp. 1260–1261.

#### REFERENCES

1. Demkovich A.Ye., Korshikov I.I., Politov D.V., Mudrik Ye.A., Los' S.A. Geneticheskaja izmenchivost' pljusovyh derev'ev *Pinus sylvestris* L. i ih semennogo potomstva po mikrosatellitnym lokusam. *Fiziologija rastenij i genetika*, 2014, vol. 46, no. 5, pp. 395–405. (In Russian)
2. Il'inov A.A., Rayevskiy B.V. Ispol'zovaniye mikrosatellitnykh lokusov v izuchenii pljusovogo genofonda sosny obyknovennoy *Pinus sylvestris* L. v Karelii. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN*, 2018, no. 6, pp. 124–134. (In Russian)

3. Il'inov A.A., Rayevskiy B.V., Chirva O.V. Sostoyaniye genofondov osnovnykh lesoobrazuyushchikh vidov vodosbora Belogo morya (na primere *Picea × fennica* (Regel) kom. i *Pinus sylvestris* L.). *Ekologicheskaya genetika*, 2020, vol. 18, no. 2, pp. 185–202. (In Russian)
4. Kal'ko G.V., Kotova T.M., Kuz'mina M.V. Mikrosatellitnyy analiz prirodnykh i iskusstvennykh populyatsiy *Pinus sylvestris* L. na Severo-Zapade Rossii. *Sovremennaya lesnaya nauka: problemy i perspektivy: Materialy vserossijskoj nauchn.-prakt. konf., Voronezh*, 2017, pp. 27–32. (In Russian)
5. Kal'ko G.V. Testirovanie yadernykh mikrosatellitnykh markerov sosny obyknovenoj. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyajstva*, 2017, no. 1, pp. 23–34. (In Russian)
6. Kamalova I.I., Peturenko M.Ju., Serdjukova A.P. Izmenchivost' mikrosatellitnykh lokusov u *Pinus sylvestris* L. iz stepnoj zony central'noj Rossii. *Lesnye jekosistemy: sovremennye vyzovy, sostojanie, produktivnost' i ustojchivost': Mat. mezhd. nauch.-prakt. konf. posvjashhennoj 90-letiju Instituta lesa NAN Belarusi*, 2020, pp. 42–47. (In Russian)
7. Krutovskiy K.V. Ot populyatsionnoj genetiki k populyatsionnoj genomike lesnykh drevesnykh vidov: integrirovannyj populyatsionno-genomnyj podkhod. *Genetika*, 2006, vol. 42, no. 10, pp. 1088–1100. (In Russian)
8. Tarakanov V.V., Palenova M.M., Parkina O.V., Rogovtsev R.V., Tret'yakova R.A. Lesnaya selektsiya v Rossii: dostizheniya, problemy, priority. *Lesokhozyajstvennaya informatsiya*, 2021, no. 1, pp. 100–143. (In Russian)
9. Sannikov S.N., Petrova I.V. *Differentsiatsiya populyatsiy sosny obyknovenoj*. Yekaterinburg, 2003, 247 p. (In Russian)
10. Milyutin L.I., Muratova Ye.N., Larionova A.Ya. Razvitiye lesnoj genetiki v Rossii. *Sibirskiy lesnoj zhurnal*, 2018, no. 1, pp. 3–15. (In Russian)
11. 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 khozyajstva*, 2021, no. 3, pp. 13–25. (In Russian)
12. Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. *Conifer Microsatellite Handbook*. Texas: A&M University, College Station, 2002. – 57 p.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 1998, no. 7 (9), pp. 1260–1261.

Статья поступила в редакцию 16.06.2022