

УДК 575.17: 582.475

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ В ИЗУЧЕНИИ ПЛЮСОВОГО ГЕНОФОНДА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. В КАРЕЛИИ

А. А. Ильинов, Б. В. Раевский

Институт леса КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

В результате исследования с помощью ядерных микросателлитных локусов (PtTX2123, PtTX2146, Spac11.8) дана сравнительная оценка генетической структуры и уровня генетического разнообразия двух плюсовых насаждений (Великая Губа и Заозерье), четырех природных популяций (Водлозеро, Заонежье, Кивач, Сортавала) и клоновой лесосеменной плантации (ЛСП) сосны обыкновенной. В отличие от естественных популяций, представленных малонарушенными сосняками скальными IV класса бонитета на относительно бедных почвах, плюсовые насаждения сосны (I–II класс бонитета) представлены черничными типами леса, сформировавшимися на сравнительно плодородных почвах. Важным моментом является производный характер плюсовых насаждений. Амплификация микросателлитных локусов в исследованных популяциях и ЛСП сосны обыкновенной позволила выявить 32 аллеля. В целом аллельное разнообразие плюсовых насаждений оказалось близким к среднему значению для исследованных популяций сосны ($A_{99\%} = 5,000–6,000$; $ne = 3,064–3,661$). Природные популяции, плюсовые насаждения и ЛСП сосны обыкновенной характеризовались различным уровнем генетической изменчивости. Плюсовые насаждения сосны, отличающиеся лучшими условиями произрастания по сравнению с естественными популяциями, показали средний уровень генетического разнообразия ($H_o = 0,521–0,588$; $H_e = 0,579–0,643$), однако отличия от природных популяций оказались статистически недостоверными. Исключение составил индекс фиксации Райта F. Максимальные значения этого показателя (0,142 и 0,106) свидетельствуют о значительном дефиците гетерозигот в плюсовых насаждениях сосны обыкновенной.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; плюсовое насаждение; клоновая лесосеменная плантация; генетическое разнообразие; ПЦР; микросателлиты.

A. A. Ilinov, B. V. Raevsky. ANALYSIS OF THE *PINUS SYLVESTRIS* L. PLUS TREE GENE POOL IN KARELIA USING MICROSATELLITE LOCI

In this work, based on the results of the microsatellite loci (PtTX2123, PtTX2146, Spac11.8) tests, we provided a comparative evaluation of the genetic structures and levels of genetic diversity of the following populations: two plus stands from Velikaya Guba and Zaozerye, four natural populations from Vodlozero, Zaonezye, Kivach, Sortavala, and a clonal seed orchard of Scots pine. Unlike the natural populations, which were represented by intact rocky pine forests growing on relatively poor soils, the plus stands were represented by secondary v. myrtillus forest stands formed on relatively fertile soils. Amplification of the microsatellite loci of the studied populations and the seed orchard of Scotch pine helped to identify 32 alleles in total. Overall, the allelic diversity of the plus stands proved

to be close to the mean value for the studied populations. The tested natural populations, plus stands, and the seed orchard of Scots pine are characterized by different levels of genetic variability. The plus stands, featuring better growing conditions in comparison with the natural populations, demonstrated an intermediate level of genetic diversity. However, the differences between them and the natural populations were statistically unreliable, and the only statistically significant parameter was the Wright fixation index F . The maximum values of this index (0.142 and 0.106) indicate a significant deficit of heterozygotes in the Scots pine plus stands.

Key words: *Pinus sylvestris* L.; plus stand; clonal seed orchard; genetic diversity; polymerase chain reaction (PCR); microsatellites.

Введение

Система плюсовой селекции основных лесобразующих видов, в том числе сосны обыкновенной, практикуется на территории России с конца 60-х годов XX века. Однако до сих пор окончательно не сформировался общепринятый методический подход в решении ее центральной проблемы – оценки наследственности плюсовых деревьев, отобранных по фенотипу. Ключевой категорией объектов в структуре постоянной лесосеменной базы является клонная лесосеменная плантация (ЛСП).

Главная задача при создании ЛСП – обеспечение лесного хозяйства улучшенными семенами лесных пород, обладающими ценными наследственными свойствами и высокими посевными качествами. Важным аспектом является сохранение и поддержание на ЛСП уровня генетического разнообразия, свойственного природным популяциям основных лесобразующих пород того или иного региона. Базой для создания клоновых ЛСП являются лучшие естественные или искусственные (плюсовые) насаждения и деревья, выделяемые при селекционной инвентаризации. При отборе плюсовых насаждений и деревьев главное внимание уделяется следующим признакам: прямоствольность, полнодревесность, хорошее очищение стволов от сучьев, устойчивость к неблагоприятным факторам среды, вредителям и болезням. В то же время до сих пор не выяснена роль генетической составляющей в продуктивности этих насаждений и отдельных деревьев.

В популяционных исследованиях в последние десятилетия особое значение приобрели ДНК-маркеры, в том числе микросателлиты. Мировой опыт показывает, что использование ДНК-маркеров позволяет решать многие задачи при исследовании древесных видов [Alden, Loopstra, 1987; Rajora et al., 1998; Hui-Yu et al., 2005; Ranger et al., 2008; Varsha et al., 2012; Rubio-Moraga et al., 2012]. В Российской Федерации сравнительно мало работ с использо-

ванием современных методов генетического анализа, основанных на применении ДНК-маркеров [Яковлев, Клейншмит, 2002; Козыренко и др., 2004; Семерикова, Семериков, 2007; Левина и др., 2008], особенно в области лесной селекции и семеноводства [Новиков, Шейкина, 2012; Криворотова, 2014; Ильинов, Раевский, 2015; Янбаев, 2017].

Анализ литературных источников дает основания для предположения, что лучшие (плюсовые) деревья будут характеризоваться и более высоким уровнем генетического разнообразия. В работе Т. Н. Криворотовой [2014], посвященной генетической изменчивости клонов плюсовых деревьев сосны обыкновенной, сделан вывод о том, что уровень генетической изменчивости, оцениваемый с использованием ISSR-маркеров, на ЛСП сосны не уступает уровню генетического разнообразия, выявленному в насаждениях из этих же географических районов. В работе П. С. Новикова и О. В. Шейкиной [2012] при исследовании генетической изменчивости деревьев разных селекционных категорий (минусовые, нормальные, плюсовые) сосны обыкновенной по ISSR-маркерам в плюсовом насаждении обнаружено, что наивысшими значениями параметров генетической изменчивости характеризовались нормальные деревья, а уровень генетической изменчивости в целом для насаждения оказался выше, чем отдельно по группам. Таким образом, генетические аспекты плюсовой селекции все еще остаются недостаточно изученными.

В Карелии при реализации системы плюсовой селекции основных лесобразующих хвойных видов (сосны обыкновенной и ели финской) были созданы 6 прививочных ЛСП I порядка общей площадью около 454 га, в том числе сосны – 365 га. На этих объектах произрастают сотни вегетативных потомств плюсовых деревьев. Однако до настоящего времени работ по изучению состояния плюсового генофонда лесобразующих видов Карелии не проводилось.

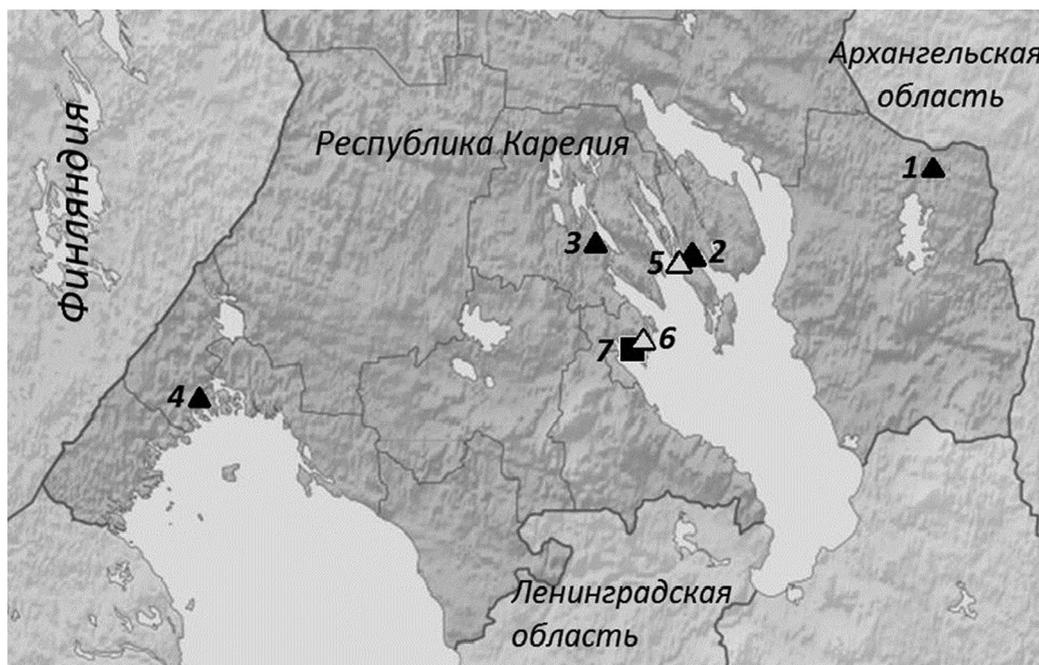


Рис. 1. Карта-схема расположения пунктов сбора материала. Природные популяции: 1 – Водлозеро; 2 – Заонежье; 3 – Кивач; 4 – Сортавала; плюсовые насаждения: 5 – Великая Губа; 6 – Заозерье; 7 – Петрозаводская ЛСП

Fig. 1. Index map of *P. sylvestris* sample collection points in Karelia. Native population: 1 – Vodlozero; 2 – Zaonezhye; 3 – Kivach; 4 – Sortavala; plus stands: 5 – Velikaya Guba; 6 – Zaozerye; 7 – Petrozavodsk clonal seed orchard

Цель исследования – изучение на основе использования ядерных микросателлитных локусов генетического разнообразия природных популяций, плюсовых насаждений и клоновых лесосеменных плантаций хвойных Карелии (на примере сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L.).

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы четыре малонарушенные популяции (Водлозеро, Заонежье, Кивач и Сортавала), два плюсовых насаждения (Великая Губа и Заозерье), а также одно поле Петрозаводской прививочной клоновой лесосеменной плантации (ЛСП) сосны обыкновенной (рис. 1). В естественных сосняках средней подзоны тайги Карелии в Южнокарельском лесосеменном районе [Лесосеменное..., 1982] были заложены постоянные пробные площади (ППП), главным образом в пределах особо охраняемых природных территорий (ООПТ). Характеристика PPP приведена в табл. 1.

Для анализа генетической структуры популяций отбирали образцы хвои и древесины (керны) с 30 модельных деревьев на каждой PPP. На ЛСП для генетического анализа были собраны образцы хвои с 30 клонов.

Выделение образцов геномной ДНК сосны осуществлялось с помощью набора Ахуррег Multisource Genomic DNA (Ахуген). Для анализа популяций сосны обыкновенной отобрали три локуса [Soranzo et al., 1998; Elsiik et al., 2000] (табл. 2).

Основными критериями для отбора микросателлитных локусов служили высокая степень информативности, полиморфности и воспроизводимости амплификации. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали 26 мкл реакционной смеси следующего состава: 50 нг ДНК исследуемых образцов, 100 пМ праймера, 5 мкл набора с Taq ДНК полимеразой («СибЭнзим», Москва). Для проведения амплификации применяли прибор iCycler iQ5 (Bio-Rad). Условия амплификации: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 53–62 °С (в зависимости от используемого праймера), полимеризация – 40 с при 72 °С; количество циклов – 35; достраивание фрагментов – 6 мин при 72 °С. Образцы ДНК анализировали методом капиллярного гель-электрофореза (Beckman Coulter CEQ800 Genetic Analysis; программное обеспечение CEQ Fragment Analysis).

Основные показатели генетической изменчивости (среднее число аллелей на локус $A_{99\%}$, среднее число аллелей с частотой > 5 %, $A_{95\%}$,

Таблица 1. Таксационная характеристика пробных площадей

Table 1. Forest taxation characteristics of sample plots

Показатель Character	Пробная площадь Sample plot					
	Водлозеро Vodlozero	Заонежье Zaonezhye	Кивач Kivach	Сортавала Sortavala	Великая Губа Velikaya Guba	Заозерье Zaozerye
1	2	3	4	5	6	7
Центральное лесничество Central forestry	НП «Водлозерский» NP "Vodlozersky"	Медвежьегорское Medvezhyegorsk	Заповедник «Кивач» Nature Reserve "Kivach"	Сортавальское Sortavala	Медвежьегорское Medvezhyegorsk	Прионежское Prionezhskiy
Участковое лесничество (квартал, выдел) Regional forest district (quarter, site)	Водлозерское (кв. 16, выд. 94) Vodlozersky (quarter 16, site 94)	Великогубское (кв. 151, выд. 6) Velikogubskoye (quarter 151, site 6)	(кв. 51, выд. 8) (quarter 51, site 8)	Ладожское (кв. 83, выд. 45) Ladoga (quarter 83, site 45)	Великогубское (кв. 48, выд. 19) Velikogubskoye (quarter 48, site 19)	Заозерское (кв. 8, выд. 13) Zaozerskoye (quarter 8, site 13)
Географические координаты, °с. ш./°в. д. Geographical coordinates, °N/°E	62,542 37,025	62,239 34,880	62,370 33,971	61,663 30,648	62,357 34,868	61,907 34,394
Состав и структура древостоя Composition and structure of the forest stand	7C ₂₀₀ 3C ₁₆₀ +C ₂₇₀	5C ₁₆₀ 5C ₁₀₀ + Б ₈₀ Е ₆₀	4C ₁₆₀ 5C ₁₀₀ 1Б	6C ₁₃₀ 3Е ₁₃₀ 1Б ₉₀	6C ₁₁₀ 2Е ₉₅ 2Б ₉₀ Ос ₁₀₀ ед.	6C ₁₁₅ 2Е ₁₁₀ 1Б ₉₀ 1Ос ₉₀
Тип возрастной структуры Type of age structure	относительно разновозрастный relatively-uneven aged	относительно разновозрастный relatively-uneven aged	относительно разновозрастный relatively-uneven aged	условно одно-возрастный conditional even-aged	одновозрастный even-aged	одновозрастный even-aged
Тип леса Forest type	брусничный vaccinium type	черничный myrtillus type	брусничный vaccinium type	брусничный vaccinium type	черничный myrtillus type	черничный myrtillus type
Класс возраста Age class	XI	VIII	VIII	VII	VI	VI
Средний диаметр, см Average diameter, cm	28	26	24	28	27,2	31,5
Средняя высота, м Average height, m	19	19	18	20	28,1	29,9
Бонитет Growth class	IV	IV	IV	IV	II	I
Относительная полнота Relative stocking	0,6	0,7	0,7	0,7	1,46	1,43
Запас, м³/га Stock volume, m³/ha	160	170	155	220	568	560

среднее эффективное число аллелей n_e , наблюдаемая H_o и ожидаемая H_e гетерозиготность, коэффициент фиксации Райта F , критерий χ^2 для оценки соответствий наблюдаемых и ожидаемых по правилу Харди – Вайнберга распределений генотипов, анализ молекулярной дисперсии AMOVA (Analysis of Molecular Variance), показатели F -статистики Райта и генетические дистанции по Нею определяли

с помощью программы GenAlEx 6.5 [Peakall, Smouse, 2006]. Построение дендрограммы на основе матрицы генетических расстояний проводили с помощью метода невзвешенного попарного арифметического среднего UPGMA [Sneath, Sokal, 1973].

Для обнаружения и исключения возможных вариантов ошибок генотипирования ядерных микросателлитных локусов использована про-

Таблица 2. Характеристика микросателлитных локусов, использованных для анализа популяций сосны обыкновенной

Table 2. Characteristics of microsatellite loci used for the analysis of the populations of Scots pine

Локус Locus	Последовательность (5' – 3') Sequence (5' – 3')	Мотив Motif	Число аллелей Number of alleles	Размер фрагмента, п. н. о. Size of the fragment, bp	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C
PtTX2123	F GAAGAACCCACAAACACAAG R GGGCAAGAATTCATGATAA	(AGC) ₈	4	192–204	57
PtTX2146	F CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG R CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG	(GAG) ₅ ... (CAG) ₈ CGG (CAG) ₇ CGG (CAG) ₄	16	168–249	57
Spac11,8	F AGGGAGATCAATAGATCATGG R CAGCCAAGACATCAAAAATG	(TG) ₁₆	12	130–154	55

грамма MICRO-CHECKER [Van Oosterhout et al., 2004].

Результаты и обсуждение

Анализ таксационных характеристик показал (табл. 1), что в отличие от естественных популяций, представленных малонарушенными сосняками скальными IV классов бонитета на относительно бедных почвах, плюсовые насаждения сосны (I–II класс бонитета) представлены черничными типами леса, сформировавшимися на сравнительно плодородных почвах. Важным моментом является производный характер плюсовых насаждений. Первое плюсовое насаждение – Великая Губа – возникло в условиях открытого пространства сплошной вырубке. Второе – Заозерье – в условиях заброшенной пашни, возобновившейся сосной в семенной год. Примерно 100 лет назад территория, занятая исследованными плюсовыми насаждениями, по какой-то причине (пожар или рубки) была достаточно быстро заселена сосной обыкновенной, которая при благоприятных условиях произрастания к V классу возраста достигла высоких показателей продуктивности, что и позволило в 80-х годах прошлого столетия выделить данные древостои в качестве плюсовых насаждений. В указанный период в этих насаждениях отмечалось наличие елового подроста, который в течение последующих 40 лет сформировал густой ярус ели. В дальнейшем следует ожидать полной смены пород, в результате чего исследованные плюсовые насаждения сосны обыкновенной превратятся в ельники.

Амплификация трех микросателлитных локусов из четырех природных популяций, двух плюсовых насаждений и ЛСП сосны обыкновенной позволила выявить 32 аллеля (табл. 3).

Все локусы были полиморфными во всех популяциях и на ЛСП. Наименее изменчивым оказался локус PtTX2123 (4 аллеля), наиболее полиморфным – локус PtTX2146 (16 аллелей). Количество редких (с частотой встречаемости < 0,05) аллелей в популяциях варьировало от 0 % (Заонежье) до 47 % (Водлозеро). Максимальное количество аллелей (21) выявлено в Сортавале и на ЛСП. Здесь же был обнаружен высокий процент редких аллелей (38 и 43 % соответственно). По количеству найденных аллелей (16) плюсовое насаждение Заозерье занимает среднее положение, уступая Сортавале, ЛСП и Водлозеру.

В то же время плюсовое насаждение Великая Губа по количеству выявленных аллелей превосходило только Заонежье, отличавшееся минимальным их количеством (табл. 3). В целом аллельное разнообразие плюсовых насаждений оказалось близким к среднему значению для исследованных популяций сосны.

Анализ с использованием критерия χ^2 (табл. 4) обнаружил достоверное несоответствие наблюдаемых и ожидаемых по правилу Харди – Вайнберга распределений генотипов по локусам Spac11.8 и PtTX2146. Несоответствие по локусу Spac11.8 отмечено во всех исследованных популяциях, а по локусу PtTX2146 – только в популяциях Водлозеро и Заонежье. По локусу PtTX2123 достоверного несоответствия наблюдаемых и ожидаемых по правилу Харди – Вайнберга распределений генотипов не обнаружено.

С помощью программы MICRO-CHECKER выявлены ошибки генотипирования: у микросателлитных локусов PtTX2146 и Spac11.8 обнаружены «нуль-аллели». Учет при генотипировании «нуль-аллелей» позволил провести корректировку для получения несмещенной оценки уровня генетического разнообразия (табл. 5)

Таблица 3. Генетическая структура популяций сосны обыкновенной, выраженная в частотах встречаемости аллелей

Table 3. Allele frequencies by population for Scots pine codominant data

Локус Locus	Аллель Allel	Популяция Population						
		Водлозеро Vodlozero	Заонежье Zaonezhye	Кивач Kivach	Сортавала Sortavala	Великая Губа Velikaya Guba	Заозерье Zaozerye	ЛСП Clonal seed orchard
		Размер выборки Sample size						
		23	30	30	30	16	17	30
PtTX2123	192	0,130	0,083	0,067	0,200	0,156	0,206	0,083
	195	0,870	0,917	0,933	0,783	0,844	0,765	0,917
	201	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000
	204	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000
PtTX2146	168	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
	171	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
	180	0,000	0,000	0,017	0,000	0,031	0,000	0,000
	183	0,152	0,783	0,583	0,183	0,219	0,147	0,300
	186	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	195	0,196	0,033	0,033	0,150	0,219	0,176	0,183
	204	0,022	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,033
	210	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000
	213	0,022	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000
	216	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
	222	0,391	0,133	0,217	0,517	0,438	0,559	0,350
	225	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	228	0,065	0,033	0,117	0,033	0,063	0,029	0,083
	237	0,087	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
243	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,017	
249	0,022	0,000	0,000	0,000	0,031	0,029	0,000	
Срас11.8	130	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
	132	0,000	0,033	0,117	0,033	0,125	0,088	0,067
	134	0,174	0,083	0,650	0,100	0,031	0,265	0,500
	136	0,761	0,400	0,133	0,400	0,594	0,206	0,067
	138	0,022	0,000	0,000	0,150	0,125	0,324	0,033
	140	0,022	0,050	0,067	0,067	0,000	0,029	0,167
	142	0,000	0,000	0,000	0,083	0,125	0,000	0,017
	144	0,000	0,433	0,033	0,017	0,000	0,059	0,050
	146	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,033
	148	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,033
	152	0,022	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,017
154	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,017	

и степени подразделенности исследованных популяций сосны обыкновенной (табл. 6).

Анализ основных параметров генетической изменчивости показал (табл. 5), что южнокарельские популяции сосны обыкновенной характеризуются довольно высоким ее уровнем. Значения основных показателей разнообразия – наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности – варьировали в пределах 0,456–0,739 и 0,471–0,714 соответственно. Уровень генетической изменчивости, обнаруженный на ЛСП,

также оказался довольно высоким, свидетельствуя о достаточной представленности генофонда сосны обыкновенной на лесосеменной плантации. Минимальными параметрами генетической изменчивости по большинству показателей выделялись популяции Заонежье и Кивач. Плюсовые насаждения сосны обыкновенной характеризовались средними значениями генетического, в том числе аллельного разнообразия. В целом, однако, выявленные различия между исследованными

Таблица 4. Результаты теста χ^2 соответствия генотипов в популяциях сосны обыкновенной ожидаемому по Харди – Вайнбергу

Table 4. Summary of Chi-Square tests for Hardy-Weinberg equilibrium

Популяция Population	Локус Locus	Число степеней свободы DF	χ^2	Табличное значение χ^2 Table value χ^2		
				Уровень значимости, q, % Significance level, q, %		
				5	1	0,1
Водлозеро Vodlozero	PtTX2123	1	0,518	3,841	6,635	10,83
	PtTX2146	45	81,540***	61,66	69,96	80,08
	Spac11,8	10	69,019***	18,31	23,21	29,59
Заонежье Zaonezhye	PtTX2123	1	0,248	3,841	6,635	10,83
	PtTX2146	10	60,626***	18,31	23,21	29,59
	Spac11,8	10	64,612***	18,31	23,21	29,59
Кивач Kivach	PtTX2123	1	0,153	3,841	6,635	10,83
	PtTX2146	15	23,125	25,00	30,58	37,70
	Spac11,8	10	90,744***	18,31	23,21	29,59
Сортавала Sortavala	PtTX2123	3	0,349	7,815	11,34	16,27
	PtTX2146	21	17,973	32,67	38,93	46,80
	Spac11,8	55	172,779***	73,31	82,29	93,17
Великая Губа Velikaya Guba	PtTX2123	1	1,335	3,841	6,635	10,83
	PtTX2146	15	15,673	25,00	30,58	37,70
	Spac11,8	10	27,845**	18,31	23,21	29,59
Заозерье Zaozerye	PtTX2123	3	4,406	7,815	11,34	16,27
	PtTX2146	15	19,468	25,00	30,58	37,70
	Spac11,8	21	64,430***	32,67	38,93	46,80
ЛСП Clonal seed orchard	PtTX2123	1	0,248	3,841	6,635	10,83
	PtTX2146	28	30,974	41,34	48,28	56,89
	Spac11,8	55	228,033***	73,31	82,29	93,17

Примечание. *** P < 0,001.

Note. *** P < 0.001.

популяциями, включая плюсовые насаждения, и ЛСП сосны обыкновенной в уровне генетического разнообразия оказались статистически недостоверными. Исключение составил индекс фиксации Райта F . Максимальные значения этого показателя (0,142 и 0,106 для древостоев Великая Губа и Заозерье соответственно) свидетельствуют о значительном дефиците гетерозигот в плюсовых насаждениях сосны обыкновенной.

Анализ подразделенности с помощью F -статистик Райта (табл. 6), рассчитанных для характеристики подразделенности и оценки уровня дифференциации между исследованными популяциями, обнаружил, что каждое дерево в среднем характеризуется 4% дефицитом гетерозигот относительно популяции ($F_{IS} = 0,039$) и 11% дефицитом ($F_{IT} = 0,109$) относительно вида. Основной вклад в избыток гомозигот вносит локус Spac11,8.

Значения F_{ST} варьировали от 0,028 для PtTX2123 до 0,099 для Spac11,8, составляя в среднем 0,073, что указывает на относительно невысокий уровень межпопуляционной дифференциации сосны обыкновенной в регионе.

Результат AMOVA-анализа также показал, что большая часть общей генетической дисперсии, обнаруженной на основе исследования микросателлитных локусов сосны обыкновенной, приходится на изменчивость внутри популяций, межпопуляционная доля составляет около 7% (рис. 2).

Для количественной оценки уровня межпопуляционной генетической дифференциации популяций сосны обыкновенной были произведены вычисления генетических дистанций Неи. Более наглядно результаты этих вычислений можно представить в виде дендрограммы, построенной на основе матрицы расстояний с помощью метода UPGMA (рис. 3).

Таблица 5. Уровень генетического разнообразия в популяциях *P. sylvestris*

Table 5. Level of genetic diversity in populations of *P. sylvestris*

Популяция Population	n	$A_{99\%}$	$A_{95\%}$	ne	H_o	H_e	F
		природные популяции native populations					
Водлозеро Vodlozero	23	6,333	3,667	3,847	0,739	0,714	-0,045
Заонежье Zaonezhye	30	4,667	3,333	2,37	0,456	0,471	0,001
Кивач Kivach	30	4,333	3,333	2,285	0,578	0,469	-0,206
Сортавала Sortavala	30	7,333	4,667	3,482	0,589	0,615	0,023
M ± m		6,618 ± 1,016	4,120 ± 0,703	3,229 ± 0,532	0,638 ± 0,093	0,612 ± 0,086	-0,063 ± 0,065
плюсовые насаждения plus stands							
Великая Губа Velikaya Guba	16	5,000	4,000	3,064	0,521	0,579	0,142
Заозерье Zaozerye	17	6,000	4,333	3,661	0,588	0,643	0,106
M ± m		5,515 ± 0,201	4,172 ± 0,146	3,371 ± 0,139	0,556 ± 0,021	0,612 ± 0,020	0,124 ± 0,008*
ЛСП clonal seed orchard							
M ± m	30	7,333 ± 2,900	3,667 ± 0,882	3,284 ± 1,079	0,611 ± 0,226	0,562 ± 0,205	-0,090 ± 0,068

Примечание. n – размер выборки; $A_{99\%}$ – среднее число аллелей на локус; $A_{95\%}$ – среднее число нередких (с частотой > 0,05) аллелей на локус; ne – эффективное число аллелей на локус; H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно; F – индекс фиксации Райта; * $p < 0,01$.

Note. n – sample size; $A_{99\%}$ – mean number of alleles per locus; $A_{95\%}$ – mean number of frequent alleles per locus (with a frequency of > 0,05); ne – effective number of alleles per locus; H_o – mean observed heterozygosity; H_e – mean expected heterozygosity; F – fixation index; * $p < 0,01$.

Таблица 6. Значения F-статистик Райта для популяций сосны обыкновенной

Table 6. F-Statistics over all *P. sylvestris* populations for each locus

Локус Locus	F-статистики F-Statistics		
	F_{is}	F_{it}	F_{st}
PtTX2123	0,038	0,066	0,028
PtTX2146	0,036	0,123	0,091
Spac11,8	0,043	0,138	0,099
M ± m	0,039 ± 0,002	0,109 ± 0,022	0,073 ± 0,022

Примечание. F_{is} – коэффициент инбридинга особи относительно популяции; F_{it} – коэффициент инбридинга особи относительно вида; F_{st} – показатель подразделенности популяций.

Note. F_{is} – the inbreeding of an individual relative to the subpopulation; F_{it} – the inbreeding of an individual relative to the total metapopulation; F_{st} – the inbreeding of the subpopulation relative to the total metapopulation.

В первый кластер вошли довольно близкие генетически ($D_N = 0,03-0,13$) южнокарельские популяции Сортавала и Водлозеро, а также плюсовые насаждения Великая Губа и Заозерье. ЛСП и Кивач также отличались невысоким значением генетического расстояния ($D_N = 0,05$). В то же время обе эти группы оказались значительно дифференцированы друг от друга ($D_N = 0,22$). Наибольшая генетическая обособленность ($D_N = 0,28$) выявлена для Заонежья, характеризующегося минимальными значениями основных показателей генетического разнообразия. Таким образом, плюсовые насаждения оказались генетически близки

к основной группе южнокарельских популяций сосны обыкновенной.

Выводы

1. Анализ основных параметров генетической изменчивости показал, что плюсовые насаждения сосны обыкновенной, характеризующиеся лучшими условиями произрастания по сравнению с естественными популяциями, отличаются средним уровнем генетического, в том числе аллельного разнообразия.
2. Значения индекса фиксации Райта F (0,142 и 0,106 для Великой Губы и Заозерья со-



Рис. 2. Соотношение различных уровней внутривидового разнообразия карельских популяций сосны обыкновенной по результатам AMOVA

Fig. 2. Results of Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for *P. sylvestris* populations

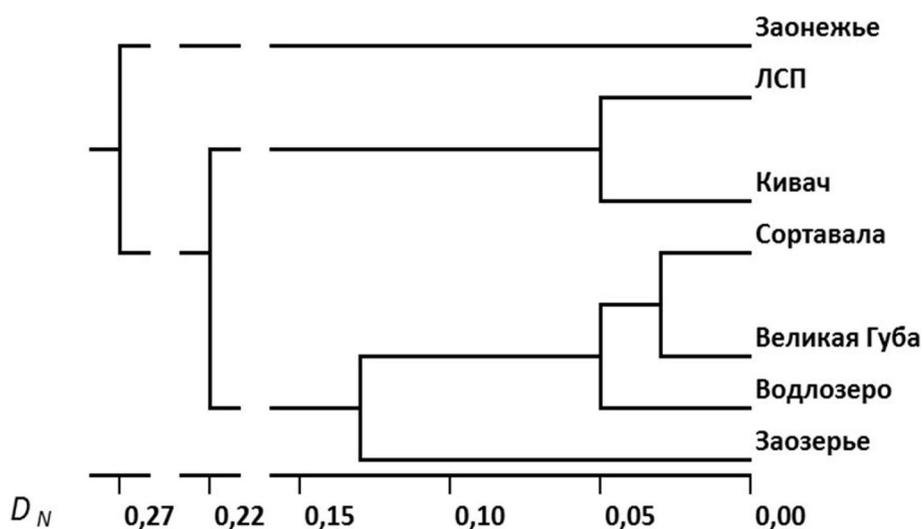


Рис. 3. Дендрограмма уровня дифференциации карельских популяций ели финской по генетическому расстоянию Неи (D_N)

Fig. 3. Dendrogram of differentiation level of Karelian populations of *P. sylvestris* according to Nei's genetic distance (D_N)

ответственно) свидетельствуют о наличии достоверного дефицита гетерозигот в плюсовых насаждениях сосны обыкновенной.

3. Среднее значение F_{st} (0,073) указывает на невысокий уровень межпопуляционной дифференциации в исследованной части ареала, что характерно для большинства панмиктических популяций, в том числе и сосны обыкновенной.

4. Количественный анализ межпопуляционной дифференциации показал, что плюсовые насаждения сосны обыкновенной генетически близки к основной группе южнокарельских популяций.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН № 41 «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России».

Литература

Ильинов А. А., Раевский Б. В. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновенной и ели финской в Карелии // Экологическая генетика. 2015. Т. XIII, № 4. С. 55–67.

Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Реунова Г. Д., Левина Е. А., Журавлев Ю. Н. Генетическая изменчивость и взаимоотношения лиственниц Сибири и Дальнего Востока по данным RAPD-анализа // Генетика. 2004. Т. 40, № 4. С. 506–515.

Криворотова Т. Н. Фенотипическая и генетическая изменчивость клонов плюсовых деревьев сосны обыкновенной в Среднем Поволжье: Автореф. ... дис. канд. с.-х. наук. Йошкар-Ола, 2014. 22 с.

Левина Е. А., Адрианова И. Ю., Реунова Г. Д., Журавлев Ю. Н. Изучение генетической изменчивости и дифференциации популяций лиственницы в пределах ареала *Larix olgensis* A. Henry в Приморском крае // Генетика. 2008. Т. 44, № 3. С. 374–380.

Лесосеменное районирование основных лесобразующих пород в СССР. М.: Лесн. пром-ть, 1982. 368 с.

Новиков П. С., Шейкина О. В. ISSR-анализ деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) различных селекционных категорий // Научный журнал КубГАУ. 2012. № 82(08). С. 1–13.

Семеринова С. А., Семеринов В. Л. Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихт *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt // Генетика. 2007. Т. 43, № 12. С. 1637–1646.

Яковлев И. А., Клейншмит Й. Генетическая дифференциация дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в европейской части России на основе RAPD-маркеров // Генетика. 2002. Т. 38, № 2. С. 207–215.

Янбаев Р. Ю. Анализ лесовосстановительных процессов в дубравах Южного Урала с применением молекулярно-биологических методов исследований: Автореф. ... дис. канд. с.-х. наук. Уфа, 2017. 19 с.

Alden J., Loopstra C. Genetic diversity and population structure of *Picea glauca* on an altitudinal gradient in interior Alaska // Can. J. Forest Res. 1987. Vol. 17. P. 1519–1526. doi: 10.1139/x87-234

Elsik C. G., Minihan V. T., Hall S. E., Scarpa A. M., Williams C. G. Low-copy microsatellite markers for

Pinus taeda L. // Genome. 2000. Vol. 43. P. 550–555. doi: 10.1139/g00-002

Hui-Yu L., Jing J., Gui-Feng L., Xu-Jun M., Jing-Xiang D., Shi-Jie L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers // J. Forest Res. 2005. Vol. 16, no. 3. P. 216–218. doi: 10.1007/bf02856818

Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. Vol. 106. P. 283–292. doi: 10.1086/282771

Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. No. 6. P. 288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

Rajora O. P., DeVerno L., Mosseler A., Innes D. J. Genetic diversity and population structure of disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus*) // Can. J. Bot. 1998. Vol. 76. P. 500–508. doi: 10.1139/b98-021

Ranger M., Nkongolo K. K., Michael P., Beckett P. Genetic Differentiation of Jack Pine (*Pinus banksiana*) and Red Pine (*P. resinosa*) Populations From Metal Contaminated Areas in Northern Ontario (Canada) Using ISSR Markers // Silvae Genetica. 2008. Vol. 57, no. 6. P. 333–340. doi: 10.1515/sg-2008-0049

Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñepla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O. Genetic diversity of *Pinus nigra* Arn. populations in Southern Spain and Northern Morocco revealed by inter-simple sequence repeat profiles // J. Mol. Sci. 2012. Vol. 13, no. 5. P. 5645–5658. doi: 10.3390/ijms13055645

Sneath P. H. A., Sokal R. R. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1973. 549 p.

Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. // Mol. Ecol. 1998. Vol. 7. P. 1260–1261.

Van Oosterhout C., Hutchinson W., Wills D., Shipley P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecol. Resour. 2004. No. 4. P. 535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Varsha A. P., Parasharami A., Thengane Shubhada R. Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances // Int. J. Biodivers. Conserv. 2012. Vol. 4, no. 5. P. 219–227. doi: 10.5897/ijbc11.23

Поступила в редакцию 11.04.2018

References

Ilinov A. A., Raevsky B. V. Comparative evaluation of the genetic diversity of natural populations and clonal seed orchards of *Pinus sylvestris* L. and *Picea fennica* (Regel) Kom. in Karelia. *Russ. J. of Genetics: Applied Research*. 2017. Vol. 7, no. 6. P. 607–616. doi: 10.17816/ecogen13455-67

Kozyrenko M. M., Artyukova E. V., Reunova G. D., Levina E. A., Zhuravlev Y. N. Genetic diversity and relationships among Siberian and Far Eastern larches inferred from RAPD Analysis. *Russ. J. of Genetics*.

2004. Vol. 40, no. 4. P. 401–409. doi: 10.1023/b:ruge.0000024978.25458.f7

Krivorotova T. N. Fenotipicheskaya i geneticheskaya izmenchivost' klonov plyusovykh derev'ev sosny obyknovennoi v Srednem Povolzh'e [Phenotypic and genetic variability of plus trees clones of Scots pine in the Middle Volga region]: Summary of PhD (Cand. of Agr.) thesis. Yoshkar-Ola, 2014. 22 p.

Levina E. A., Adrianova I. Y., Reunova G. D., Zhuravlev Y. N. Genetic variability and differentiation

in the larch populations within the range of *Larix olgensis* A. Henry in Primorye. *Russ. J. of Genetics*. 2008. Vol. 44, no. 3. P. 320–325. doi: 10.1134/s1022795408030125

Lesosemennoe raionirovanie osnovnykh leso-obrazuyushchikh porod v SSSR [Forest seed zoning of the main forest-forming species in the USSR]. Moscow: Les. prom-t', 1982. 368 p.

Novikov P. S., Sheikina O. V. ISSR-analiz derev'ev sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris*) razlichnykh selektsionnykh kategorii [ISSR-analysis of *Pinus sylvestris* pine trees of different breeding categories]. *Nauch. zhurn. KubGAU* [Scientific J. KubSAU]. 2012. No. 82(08). P. 1–13.

Semerikova S. A., Semerikov V. L. The diversity of chloroplast microsatellite loci in Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.) and two Far East fir species *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. and *A. sachalinensis* Fr. Schmidt. *Russ. J. of Genetics*. 2007. Vol. 43, no. 12. P. 1373–1381. doi: 10.1134/s102279540712006x

Yakovlev I. A., Kleinshmit J. Genetic differentiation of pedunculate oak *Quercus robur* L. in the European part of Russia based on RAPD markers. *Russ. J. of Genetics*. 2002. Vol. 38, no. 2. P. 148–155.

Yanbaev R. Y. Analiz lesovosstanovitel'nykh protsessov v dubravakh Yuzhnogo Urala s primeneniem molekulyarno-biologicheskikh metodov issledovaniya [Analysis of reforestation processes in the oak forests of the Southern Urals using molecular biological methods]: Summary of PhD (Cand. of Agrical.) thesis. Ufa, 2017. 19 p.

Alden J., Loopstra C. Genetic diversity and population structure of *Picea glauca* on an altitudinal gradient in interior Alaska. *Can. J. Forest Res.* 1987. Vol. 17. P. 1519–1526. doi: 10.1139/x87-234

Elsik C. G., Minihan V. T., Hall S. E., Scarpa A. M., Williams C. G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*. 2000. Vol. 43. P. 550–555. doi: 10.1139/g00-002

Hui-Yu L., Jing J., Gui-Frng L., Xu-Jun M., Jing-Xiang D., Shi-Jie L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. *J. Forest Res.* 2005. Vol. 16, no. 3. P. 216–218. doi: 10.1007/bf02856818

Nei M. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 1972. Vol. 106. P. 283–292. doi: 10.1086/282771

Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 2006. Vol. 6, no. 1. P. 288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

Rajora O. P., DeVerno L., Mosseler A., Innes D. J. Genetic diversity and population structure of disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Can. J. Bot.* 1998. Vol. 76, no. 3. P. 500–508. doi: 10.1139/b98-021

Ranger M., Nkongolo K. K., Michael P., Beckett P. Genetic Differentiation of Jack Pine (*Pinus banksiana*) and Red Pine (*P. resinosa*) Populations From Metal Contaminated Areas in Northern Ontario (Canada) Using ISSR Markers. *Silvae Genetica*. 2008. Vol. 57, no. 6. P. 333–340. doi: 10.1515/sg-2008-0049

Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñebla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O. Genetic diversity of *Pinus nigra* Arn. populations in Southern Spain and Northern Morocco revealed by inter-simple sequence repeat profiles. *J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13, no. 5. P. 5645–5658. doi: 10.3390/ijms13055645

Sneath P. H. A., Sokal R. R. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1973. 549 p.

Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol. Ecol.* 1998. Vol. 7. P. 1260–1261.

Van Oosterhout C., Hutchinson W., Wills D., Shipley P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Resour.* 2004. No. 4. P. 535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Varsha A. P., Parasharami A., Thengane Shubhada R. Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances. *Int. J. Biodivers. Conserv.* 2012. Vol. 4, no. 5. P. 219–227. doi: 10.5897/ijbc.11.23

Received April 11, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ильинов Алексей Алексеевич

старший научный сотрудник лаб. лесных биотехнологий,
к. с.-х. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ialexa33@yandex.ru
тел.: +79114261164

Раевский Борис Владимирович

старший научный сотрудник лаб. лесных биотехнологий,
д. с.-х. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: borisraevsky@gmail.com

CONTRIBUTORS:

Ilinov, Aleksey

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ialexa33@yandex.ru
tel.: +79114261164

Raevsky, Boris

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: borisraevsky@gmail.com