


DOI 10.18699/vjgb-24-17

## Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье по ISSR-маркерам

О.В. Шейкина , Е.М. Романов 

Поволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия  
 shejkinaov@volgatech.net

**Аннотация.** Снижение уровня изменчивости селекционных популяций лесных древесных видов, представляющих собой совокупность отобранных плюсовых деревьев, считается одной из ключевых проблем в лесной селекции. Она связана с опасностью потери генетического разнообразия будущих искусственно созданных лесов, а также с риском возникновения инбредной депрессии семенного потомства плюсовых деревьев. Эффективным инструментом для изучения изменчивости, определения особенностей генетической структуры и степени дифференциации растений являются ДНК-маркеры. Наше исследование направлено на оценку уровня генетического разнообразия и степени дифференциации плюсовых деревьев разного географического происхождения с применением ISSR-маркеров. С использованием шести ISSR-праймеров изучено 270 плюсовых деревьев из Пензенской области, Чувашской Республики, Республик Татарстан и Марий Эл. Сравнимые выборки характеризовались разным уровнем генетического разнообразия. Всего для шести ISSR-праймеров обнаружено 215 ПЦР-фрагментов, при этом у разных выборок число амплифицированных фрагментов варьировало от 186 до 201. Основные показатели генетической изменчивости находились в следующих пределах: доля полиморфных локусов 95.7–96.9 %, число аллелей на локус 1.96–1.97, число эффективных аллелей 1.31–1.48, индекс Шеннона 0.291–0.429, ожидаемая гетерозиготность 0.205–0.298. По результатам анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) установлено, что 82 % варибельности ISSR-локусов обнаруживается внутри выборок плюсовых деревьев и только 18 % приходится на изменчивость между сравниваемыми группами деревьев из разных географических районов. Построение UPGMA-дендрограммы показало близость генетической структуры плюсовых деревьев из Пензенской области, Чувашской Республики и Республики Татарстан и обособленность плюсового генофонда сосны обыкновенной из Республики Марий Эл. Результаты исследований указывают на то, что уровень генетического разнообразия, структура генетической изменчивости и характер дифференциации плюсовых деревьев соответствуют ранее выявленным для природных популяций сосны обыкновенной в Среднем и Верхнем Поволжье.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; плюсовые деревья; генетическое разнообразие; дифференциация; ISSR-маркеры.

**Для цитирования:** Шейкина О.В., Романов Е.М. Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье по ISSR-маркерам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2): 148-154. DOI 10.18699/vjgb-24-17

## Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plus trees in the Middle and Upper Volga Region with the use of ISSR markers

O.V. Sheikina , E.M. Romanov 

Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola, Russia  
 shejkinaov@volgatech.net

**Abstract.** One of the serious issues in forest breeding is how to reduce the variability level in breeding populations of forest tree species that is a set of selected plus trees. The problem is that variability is jeopardized by the risk of losing the genetic diversity of future artificial forests, as well as emerging inbreeding depression in the seed plus trees progeny. DNA markers are an effective tool to study variability, identify features of the genetic structure and degree of plant differentiation. The research focuses on assessing the level of the genetic diversity and the degree of differentiation of plus trees of various geographic origin with the use of ISSR markers. We used six ISSR primers to study 270 plus trees grown in the Penza region, the Chuvash Republic, the Republic of Tatarstan and the Mari El Republic. The samples of plus trees under study were characterized by different levels of genetic diversity. Two hundred fifteen PCR fragments were identified for six ISSR primers in total, while the number of amplified fragments varied from 186 to 201 in different plus trees samples. The genetic variability varied within the following limits: 95.7–96.9 %, polymorphic loci; 1.96–1.97, the number of alleles per locus; 1.31–1.48, the number of effective alleles per locus; finally, 0.291–0.429, Shannon's index; 0.205–0.298, the expected heterozygosity. According to the analysis of molecular variance (AMOVA), 82 % of the variability of ISSR markers is typical for the plus tree samples, while only 18 % is variability among the compared groups of trees from different geographical zones. The dendrogram generated by UPGMA showed that the plus trees grown in the Penza region, the Chuvash Republic and the Republic

of Tatarstan are similar in term of the genetic structure of plus trees, while the plus gene pool of Scots pine from the Mari El Republic stands alone. The results of the research prove that the level of genetic diversity, the structure of genetic variability, and the nature of differentiation of plus trees are consistent with those previously elicited for natural populations of Scots pine in the Middle and Upper Volga region.

Key words: *Pinus sylvestris* L.; plus trees; genetic diversity; differentiation; ISSR markers.

**For citation:** Sheikina O.V., Romanov E.M. Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plus trees in the Middle and Upper Volga Region with the use of ISSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):148-154. DOI 10.18699/vjgb-24-17

## Введение

Селекционное семеноводство основных лесобразующих видов в России преимущественно базируется на массовом отборе плюсовых деревьев (Тараканов и др., 2021). Плюсовые деревья отбираются в естественных насаждениях по ряду фенотипических признаков: высоте, диаметру, качеству ствола, устойчивости к болезням и т. д. Для массового получения семян лесных древесных видов вегетативным потомством плюсовых деревьев создают лесосеменные плантации первого порядка, которые стали неотъемлемой частью лесосеменной базы (Царев и др., 2021). При реализации программ лесного семеноводства для сосны обыкновенной на принципах плюсовой селекции актуальными являются проблема снижения генетического разнообразия плюсового генофонда вследствие отбора ограниченного числа плюсовых деревьев, а также риск возникновения инбредной депрессии семенного потомства по причине близкого расположения родственных клонов на лесосеменных плантациях (Koelewijn et al., 1999; Hosius et al., 2006). Поэтому требуется проведение исследований, направленных на изучение разнообразия отобранного плюсового генофонда и выявление характера его дифференциации с привлечением как морфометрических признаков (Тараканов, Кальченко, 2015; Бессчетнова, Бессчетнов, 2017), так и молекулярных маркеров (Шигапов, 1995; Милютин и др., 2013; Ильинов, Раевский, 2021).

Молекулярные маркеры – эффективный инструмент для решения широкого спектра вопросов в области лесной селекции и семеноводства, в том числе для оценки генетического разнообразия плюсовых деревьев (Шейкина, 2022б). Для оценки изменчивости плюсовых деревьев сосны обыкновенной и созданных их потомством лесосеменных плантаций использованы изоферменты (Шигапов, 1995), ISSR-маркеры (Милютин и др., 2013; Khanova et al., 2020) и микросателлиты (Ильинов, Раевский, 2021; Камалов и др., 2022). При сравнительных исследованиях генетического разнообразия плюсового генофонда древесных видов и природных популяций получены противоречивые результаты. В ряде работ отмечается, что плюсовые деревья могут характеризоваться сравнимым с природными популяциями уровнем генетической изменчивости (Bergman, Ruetz, 1991; Ильинов, Раевский, 2023). В других публикациях встречаются данные о снижении аллельного разнообразия в выборках плюсовых деревьев, произрастающих на лесосеменных плантациях (Шигапов, 1995; Ильинов, Раевский, 2015).

На территории Среднего и Верхнего Поволжья полиморфизм ISSR-локусов был исследован лишь для небольшой выборки 36 плюсовых деревьев в Республике Марий Эл (Милютин и др., 2013). Оценка генетического

разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной в других частях Среднего и Верхнего Поволжья ранее не проводилась. В то же время ISSR-маркеры были использованы для выявления особенностей популяционно-генетической структуры сосны обыкновенной в Китае (Hui-yu et al., 2005), Португалии (Cipriano et al., 2013), на Восточно-Европейской равнине и Урале (Видякин и др., 2015; Vasilyeva et al., 2021; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022), в Пермском крае (Пришнинская и др., 2019) и в Поволжье (Шейкина, 2022а).

Цель настоящей работы заключалась в изучении генетической изменчивости и дифференциации плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Среднего Поволжья на основе анализа ISSR-маркеров. Мы предположили, что уровень генетического разнообразия, структура генетической изменчивости и характер дифференциации плюсовых деревьев, отобранных в результате селекционных мероприятий, соответствуют ранее выявленным для природных популяций сосны обыкновенной в Среднем и Верхнем Поволжье.

## Материалы и методы

Объектом изучения были плюсовые деревья сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) или их клоны из четырех районов Среднего и Верхнего Поволжья. Образцы для молекулярно-генетических исследований в Республике Татарстан заготовлены непосредственно с плюсовых деревьев, произрастающих на территории Зеленодольского лесничества. Остальные образцы получены с клонов плюсовых деревьев, произрастающих на объектах лесного семеноводства: в Чувашской Республике – с лесосеменной плантации первого порядка в Ибресинском лесничестве, в Пензенской области – с лесосеменной плантации первого порядка в Чаадаевском лесничестве, в Республике Марий Эл – с коллекционно-маточного участка в Сернурском лесничестве. Всего изучено 270 деревьев.

Источником ДНК служила высушенная хвоя. Препараты ДНК получены с использованием СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). ПЦР выполнена с применением шести ISSR-праймеров: (CA)<sub>6</sub>AGCT, (CA)<sub>6</sub>AG, (CA)<sub>6</sub>GT, (CA)<sub>6</sub>AC, (AG)<sub>8</sub>T и (AG)<sub>8</sub>GCT (Hui-yu et al., 2005). ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе: 94 °C – 5 мин; 35 циклов: 94 °C – 45 с, 60 °C – 45 с, 72 °C – 45 с; 72 °C – 7 мин. Для постановки ПЦР использовали компоненты коммерческого набора Epcyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) в следующей концентрации: 10× ПЦР-буфер – 1 мкл; dNTPs – 0.2 мкл (10 mM); праймер – 0.1 мкл (100 мкM); препарат ДНК – 1 мкл (20 нг); Taq-полимераза – 0.1 мкл (2 ед./мкл); вода – 7.6 мкл. Чтобы проверить воспроизводимость полученных ДНК-фин-

герпринтов, ПЦР с каждым образцом проводили в трехкратной повторности. Визуализацию результатов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в 1.5 % агарозном геле в 1× TBE буфере при напряжении электрического поля 80 В и окрашивании раствором этидия бромидом. Изображения гелей получены с применением системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США) и программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. Расчет длин ПЦР-фрагментов осуществлен по отношению к маркеру “100 bp+3.0 kb DNA Ladder” («Евроген», Россия).

Интерпретация результатов молекулярно-генетического анализа проведена на основе составления бинарной матрицы, в которой присутствующие на электрофореграмме ПЦР-фрагменты обозначались как «1», а отсутствующие – как «0». Расчет показателей генетического разнообразия, анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) и анализ главных координат (PCoA) выполнены в программе GenAlEx (Peakall, Smouse, 2012). Статистическую значимость различий между средними значениями показателей генетического разнообразия выборок плюсовых деревьев оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Дендрограмма, иллюстрирующая генетическое взаимоотношение выборок плюсовых деревьев, построена на основе частот встречаемости ISSR-локусов в программе POPTREEW (Takezaki et al., 2014) невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) с бутстреп-поддержкой 10000 репликаций.

## Результаты

Для шести ISSR-праймеров выявлено 215 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 99.5 % оказались полиморфными (табл. 1). Число ПЦР-фрагментов в выборках плюсовых деревьев разного географического происхождения варьировало от 186 в Республике Марий Эл до 201 в Пензенской области, а доля полиморфных локусов находилась в интервале от 95.7 до 96.9 %. Число редких ПЦР-фрагментов с частотой встречаемости менее 5 % в разных выборках варьировало от 1 до 23, а число уникальных – от 0 до 2.

Изученные выборки плюсовых деревьев различались по информационному индексу Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Наименьшие значения показателей выявлены для плюсовых деревьев из Республики Марий Эл

( $I = 0.291$ ,  $Ne = 0.205$ ). Максимальные значения генетической изменчивости определены для сосны из Пензенской области ( $I = 0.429$ ,  $Ne = 0.298$ ). Различия между выборками значимы ( $p = 0.01$ ). По числу аллелей на locus и числу эффективных аллелей плюсовые деревья разного географического происхождения не отличались ( $Na = 1.96–1.97$ ,  $Ne = 1.31–1.48$ ) при  $p = 0.01$ . В целом для всех деревьев число аллелей на locus составило 1.99, эффективных аллелей – 1.37, индекс Шеннона – 0.363, ожидаемая гетерозиготность – 0.230. Примеры спектров ПЦР-фрагментов приведены на рис. 1.

Использование разных ISSR-праймеров при ПЦР позволило проанализировать от 27 до 40 локусов, из которых 80.6–93.5 % являются полиморфными (табл. 2). Высокий уровень полиморфизма позволяет говорить о том, что рассмотренный набор маркеров может быть полезным и информативным инструментом при оценке генетической изменчивости как природных популяций хозяйственно ценного вида, так и лесных культур и объектов единого генетико-селекционного комплекса, к которому в том числе относятся плюсовые деревья. Другие показатели генетического разнообразия для разных ISSR-праймеров варьировали в следующих пределах: число аллелей на locus – от 1.62 до 1.90, число эффективных аллелей – от 1.31 до 1.41, индекс Шеннона – от 0.331 до 0.393, ожидаемая гетерозиготность – от 0.206 до 0.252.

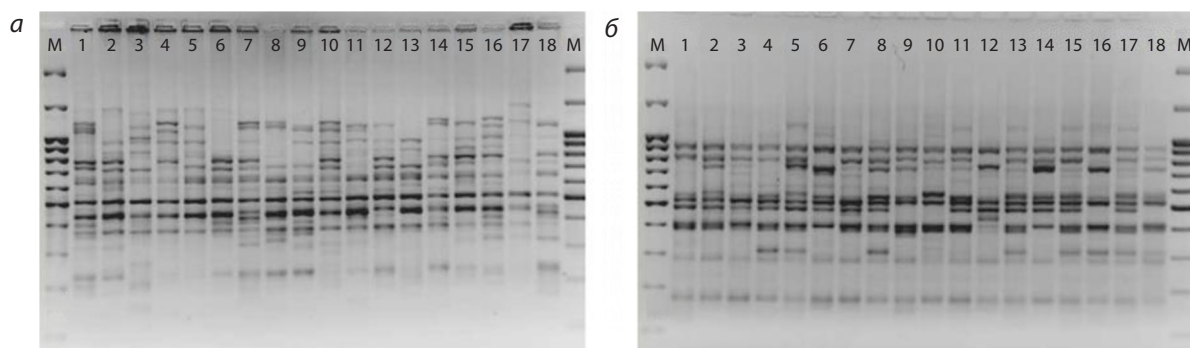
Анализ молекулярной дисперсии выявил, что 82 % генетической изменчивости распределено внутри выборок плюсовых деревьев из разных географических районов Среднего Поволжья (табл. 3). На межпопуляционную изменчивость приходится 18 % генетического разнообразия. Попарные сравнения плюсовых деревьев из разных географических районов показали, что на межпопуляционную изменчивость может приходиться от 14 до 24 %. Наибольшей генетической подразделенностью характеризуются выборки из Пензенской области и Республики Марий Эл (24 %), а также из Чувашской Республики и Республики Марий Эл (23 %). Для остальных случаев доля межпопуляционной изменчивости составила 14–16 %. Во всех случаях уровень значимости  $p < 0.001$ .

На UPGMA-дендрограмме с высоким значением бутстреп-поддержки (100) выборки деревьев из Пензенской области, Республики Татарстан и Чувашской Республики

**Таблица 1.** Показатели генетического разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной

Географическое происхождение	Число деревьев	N ( $N_{05}$ , R)	P, %	Na	Ne	I	Ne
Пензенская область	63	201 (1, 1)	96.5	1.96 ± 0.013	1.48 ± 0.021	0.429 ± 0.014	0.298 ± 0.010
Республика Татарстан	66	199 (23, 1)	96.9	1.97 ± 0.021	1.36 ± 0.021	0.343 ± 0.015	0.232 ± 0.011
Чувашская Республика	70	194 (6, 2)	95.7	1.96 ± 0.020	1.44 ± 0.022	0.391 ± 0.016	0.273 ± 0.010
Республика Марий Эл	71	186 (4, 0)	95.7	1.96 ± 0.020	1.31 ± 0.020	0.291 ± 0.015	0.205 ± 0.010
Итого	270	215	99.5	1.99 ± 0.020	1.37 ± 0.011	0.363 ± 0.008	0.230 ± 0.006
F-критерий Фишера ( $F_{0,01} = 4.94$ )	–	–	–	0.07	0.99	14.87	13.92

Примечание. Здесь и в табл. 2: N – число ПЦР-фрагментов;  $N_{05}$  – число ПЦР-фрагментов с частотой <5 %; R – число уникальных ПЦР-фрагментов; P – процентное содержание полиморфных локусов; Na – число аллелей на locus; Ne – число эффективных аллелей; I – индекс Шеннона; Ne – ожидаемая гетерозиготность. Данные приведены как среднее значение ± стандартная ошибка.



**Рис. 1.** ДНК-профили, показывающие полиморфизм плюсовых деревьев сосны обыкновенной, полученные с ISSR-праймерами (CA)<sub>6</sub>AGCT (а) и (AG)<sub>8</sub>T (б).

1–18 – номера образцов ДНК; М – маркер длин ДНК 100 bp + 3.0 kb DNA Ladder.

**Таблица 2.** Показатели генетического разнообразия ISSR-праймеров

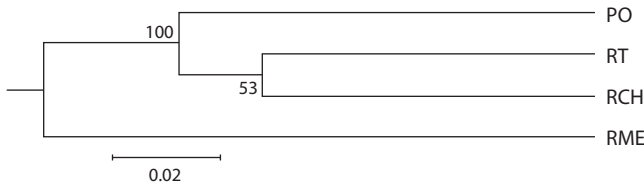
ISSR-праймер	N (N <sub>05</sub> )	P, %	Na	Ne	I	He
(CA) <sub>6</sub> AGCT	34 (2)	81.6	1.65 ± 0.064	1.36 ± 0.026	0.359 ± 0.020	0.228 ± 0.014
(CA) <sub>6</sub> AG	40 (1)	86.3	1.77 ± 0.048	1.31 ± 0.023	0.331 ± 0.017	0.206 ± 0.012
(CA) <sub>6</sub> GT	35 (0)	92.9	1.90 ± 0.033	1.41 ± 0.029	0.338 ± 0.019	0.248 ± 0.014
(CA) <sub>6</sub> AC	39 (1)	91.0	1.88 ± 0.033	1.35 ± 0.024	0.363 ± 0.017	0.227 ± 0.012
(AG) <sub>8</sub> T	27 (0)	93.5	1.89 ± 0.042	1.41 ± 0.033	0.393 ± 0.021	0.252 ± 0.016
(AG) <sub>8</sub> GCT	40 (3)	80.6	1.62 ± 0.062	1.37 ± 0.025	0.359 ± 0.019	0.231 ± 0.013

**Таблица 3.** Распределение внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости

плюсовых деревьев сосны обыкновенной по результатам анализа молекулярной дисперсии

Источник изменчивости	df	SS	MS	V	Доля изменчивости, %
Для всех выборок					
Между популяциями	3	1409.3	469.7	6.5	18.0
Внутри популяций	299	8040.9	30.2	30.2	82.0
Пензенская область и Республика Татарстан					
Между популяциями	1	428.9	428.9	6.1	16.0
Внутри популяций	127	4148.7	32.7	32.7	84.0
Пензенская область и Чувашская Республика					
Между популяциями	1	405.3	405.3	5.6	14.0
Внутри популяций	131	4516.9	34.5	34.5	86.0
Пензенская область и Республика Марий Эл					
Между популяциями	1	642.3	642.3	9.2	24.0
Внутри популяций	132	3924.4	29.7	29.7	76.0
Республика Татарстан и Чувашская Республика					
Между популяциями	1	395.4	395.4	5.4	15.0
Внутри популяций	134	4116.5	30.7	30.7	85.0
Республика Татарстан и Республика Марий Эл					
Между популяциями	1	332.8	332.8	4.5	15.0
Внутри популяций	135	3523.9	26.1	26.1	85.0
Чувашская Республика и Республика Марий Эл					
Между популяциями	1	608.7	608.7	8.2	23.0
Внутри популяций	139	3892.2	28.0	28.0	77.0

Примечание. df – число степеней свободы; SS – сумма квадратов; MS – стандартное отклонение; V – дисперсия.



**Рис. 2.** UPGMA-дендрограмма, построенная с использованием генетической дистанции Нея между плюсовыми деревьями *P. sylvestris* L.

PO – Пензенская область, RT – Республика Татарстан, RCH – Чувашская Республика, RME – Республика Марий Эл.

вошли в один кластер (рис. 2). Выборка плюсовых деревьев из Республики Марий Эл отнесена к отдельному кластеру.

На основе попарных генетических дистанций Нея выполнен анализ главных координат для отдельных деревьев сосны обыкновенной (рис. 3, а) и выборок плюсовых деревьев (рис. 3, б). РСоА анализ для особей показал, что три главные оси отвечают за 17.03 % полиморфизма ISSR-локусов, при этом на первую координату приходится 8.45 %, а на вторую – 4.96 % всей изменчивости. На уровне выборок плюсовых деревьев 81.02 % всего разнообразия приходится на первую и вторую координату. Ярко выраженных географических градиентов по осям не выявлено. Однако можно отметить сходство в распределении выборок на первой оси с расположением районов отбора плюсовых деревьев по отношению к р. Волге по первой оси: плюсовые деревья из Республик Марий Эл и Татарстан произрастают на левом берегу, тогда как из Пензенской области и Чувашской Республики – на правом.

### Обсуждение

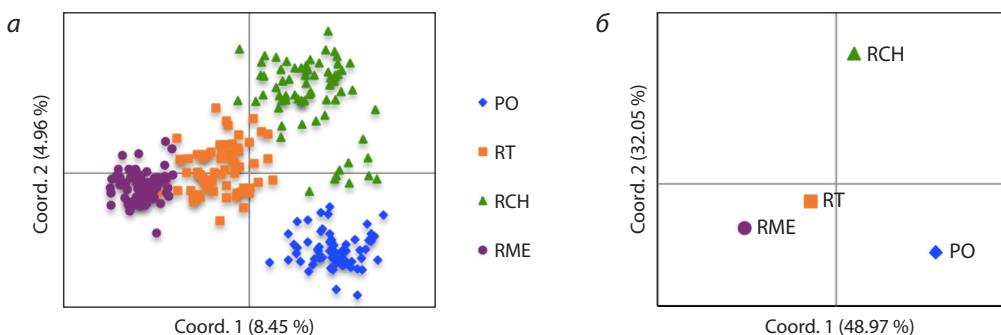
В настоящей работе выполнена оценка генетической изменчивости и дифференциации плюсового генофонда сосны обыкновенной из разных районов Среднего и Верхнего Поволжья. Для сохранения генетического разнообразия вида в процессе искусственного восстановления важно, чтобы селекционные популяции характеризовались высоким уровнем изменчивости. Из литературы известно, что доля полиморфных ISSR-локусов в популяциях сосны обыкновенной варьирует от 42 до 100 % (Hui-yu et al., 2005; Cipriano et al., 2013; Видякин и др., 2015; Пришневская и др., 2019). Для изученных выборок плюсовых деревьев и подобранных маркеров этот показатель варьиро-

вал в пределах 95.7–96.9 % и в среднем составил 99.5 %, что хорошо согласуется с результатами других исследований. Полученное значение доли полиморфных локусов для плюсовых деревьев было сопоставимо с данными для 12 природных популяций сосны обыкновенной (96.7 %) из Верхнего и Среднего Поволжья, проанализированных тем же набором ISSR-маркеров (Шейкина, 2022а).

Другие показатели генетического разнообразия, установленные для исследованных выборок плюсовых деревьев, тоже не уступали значениям, выявленным для природных популяций. Так, число эффективных аллелей и ожидаемая гетерозиготность для плюсовых деревьев составили 1.31–1.48 и 0.205–0.298 соответственно, тогда как для природных популяций – 1.27–1.39 и 0.174–0.241 (Шейкина, 2022а). Близкое значение ожидаемой гетерозиготности ISSR-локусов ( $H_e = 0.239$ ) установлено для плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Республики Башкортостан (Khanova et al., 2020). Меньшие значения ожидаемой гетерозиготности были характерны для популяций сосны обыкновенной на Русской равнине ( $H_e = 0.046–0.239$ ) (Видякин и др., 2015; Пришневская и др., 2019; Vasilyeva et al., 2021; Sboeva et al., 2022) и Урале ( $H_e = 0.149–0.185$ ) (Chertov et al., 2022). Для португальских популяций показаны (Cipriano et al., 2013) высокие значения ожидаемой гетерозиготности ( $H_e = 0.447–0.488$ ), в 1.5–2.4 раза превышающие приведенные выше значения.

Индекс Шеннона в изученных нами выборках плюсовых деревьев варьировал от 0.331 до 0.393. В других исследованиях индекс Шеннона, установленный для популяций из разных частей России, составил 0.087–0.357 (Vasilyeva et al., 2021; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022). Более высокие значения индекса Шеннона ( $I = 0.636–0.681$ ) определены для популяций сосны обыкновенной из Португалии (Cipriano et al., 2013). Различия в уровнях генетического разнообразия могут быть обусловлены как географической вариабельностью, так и тем фактом, что в исследованиях использованы разные наборы и количество ISSR-маркеров.

На основе анализа молекулярной дисперсии плюсовых деревьев сосны разного географического происхождения выявлено, что 18 % изменчивости ISSR-локусов приходится на межпопуляционную компоненту. Это согласуется с данными, ранее полученными для природных популяций сосны обыкновенной в Верхнем и Среднем Поволжье (14 %) (Шейкина, 2022а). Для популяций с Восточно-



**Рис. 3.** Расположение в пространстве главных координат (РСоА) плюсовых деревьев сосны обыкновенной (а) и географических происхождений (б).

PO – Пензенская область, RT – Республика Татарстан, RCH – Чувашская Республика, RME – Республика Марий Эл.

Европейской равнины и Урала значение этого параметра может достигать 37–48 % (Vasilyeva et al., 2021; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022). Оценка дифференциации популяций сосны обыкновенной в разных частях ареала на основе определения показателя генетической подразделенности (*Gst*) показала, что на долю межпопуляционной компоненты изменчивости ISSR-локусов может приходиться от 5.8 до 55.8 % (Hui-yu et al., 2005; Cipriano et al., 2013; Видякин и др., 2015; Vasilyeva et al., 2021; Шейкина, 2022a; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022). Относительно низкие значения показателя генетической подразделенности получены для популяций со Среднего Урала (*Gst* = 0.155) (Sboeva et al., 2022) и из Португалии (*Gst* = 0.058) (Cipriano et al., 2013). Большой генетической подразделенностью по сравнению с изученными выборками плюсовых деревьев отличались популяции из Китая (*Gst* = 0.396) (Hui-yu et al., 2005), с Восточно-Европейской равнины (*Gst* = 0.439–0.558) (Видякин и др., 2015; Vasilyeva et al., 2021; Sboeva et al., 2022) и Урала (*Gst* = 0.362) (Chertov et al., 2022). Показатель генетической подразделенности природных популяций из Верхнего и Среднего Поволжья составил 0.161 (Шейкина, 2022a). Таким образом, данные по структуре генетической изменчивости выборок плюсовых деревьев, полученные в нашем исследовании, в целом не противоречат более ранним результатам, описанным для природных популяций сосны обыкновенной.

Кластеризация выборок UPGMA-методом выявила обособленность плюсового генофонда сосны обыкновенной из Республики Марий Эл от трех других групп деревьев. Выборки деревьев из Пензенской области, Чувашской Республики и Республики Татарстан составляют единый кластер с близкой генетической структурой. При изучении популяционной структуры сосняков в Среднем и Верхнем Поволжье также установлены отличия популяций из Республики Марий Эл, расположенных на правом берегу р. Волги, от левобережных популяций из Чувашской Республики и Пензенской области (Шейкина, 2022a). Выявленная дифференциация популяций и плюсовых генофондов сосны обыкновенной разного географического происхождения может быть результатом пересечения миграционных путей вида в последниковый период. В частности, с помощью аллозимного анализа показано, что в формировании генофонда популяций сосны обыкновенной на Восточно-Европейской равнине могли принимать участие пять разных плейстоценовых рефугиумов (Санников и др., 2020).

## Заключение

Изученные выборки плюсовых деревьев из разных частей Среднего и Верхнего Поволжья различаются между собой по уровню полиморфизма ISSR-локусов. Отобранный в процессе селекционных мероприятий плюсовой генофонд сосны обыкновенной характеризуется сопоставимым с природными популяциями уровнем генетического разнообразия в регионе исследования. Структура генетической изменчивости и характер дифференциации выборок плюсовых деревьев разного географического происхождения тоже соответствуют популяционно-генетической структуре природных популяций.

Полученные нами результаты подтверждают возможность использования ISSR-маркеров в изучении популяционной генетической структуры сосны обыкновенной, отмеченную А.И. Видякиным с коллегами (Видякин и др., 2015), а высокий уровень изменчивости отобранных локусов (80.6–93.5 %) позволяет рекомендовать данный набор для оценки генетической изменчивости природных популяций, лесных культур и объектов единого генетико-селекционного комплекса. Для повышения надежности оценки генетического разнообразия и дифференциации плюсовых деревьев в будущем необходимо провести исследования с применением других типов молекулярных маркеров.

## Список литературы / References

- Бессчетнова Н.Н., Бессчетнов В.П. Изменчивость морфометрических признаков хвоя на клоновой плантации плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2):198-206. DOI 10.18699/VJ17.237 [Besschetnova N.N., Besschetnov V.P. Variability of morphometrical characteristics of needles at a clonal plantation of plus trees of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):198-206. DOI 10.18699/VJ17.237 (in Russian)]
- Видякин А.И., Боронникова С.В., Нечаева Ю.С., Пришневская Я.В., Бобошина И.В. Генетическая изменчивость, структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на северо-востоке Русской равнины по данным молекулярно-генетического анализа. *Генетика*. 2015;51(12):1401-1409. DOI 10.7868/S0016675815120139 [Vidyakin A.I., Boronnikova S.V., Nechayeva Y.S., Pryshnivskaya Y.V., Boboshina I.V. Genetic variation, population structure, and differentiation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the northeast of the Russian plain as inferred from the molecular genetic analysis data. *Russ. J. Genet.* 2015;51(12):1213-1220. DOI 10.1134/S1022795415120133]
- Ильинов А.А., Раевский Б.В. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновенной и ели финской в Карелии. *Экол. генетика*. 2015;13(4):55-67 [Ilinov A.A., Raevskiy 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. Genet. Appl. Res.* 2017;7(6):607-616. DOI 10.1134/S2079059717060065]
- Ильинов А.А., Раевский Б.В. Генетическое разнообразие деревьев сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. различных селекционных категорий в плюсовых насаждениях Карелии. *Экол. генетика*. 2021;19(1):23-35. DOI 10.17816/ecogen50176 [Ilinov A.A., Raevsky B.V. Genetic diversity of scots pine trees of different selection categories in plus stands of Karelia. *Ekologicheskaya Genetika* = *Ecological Genetics*. 2021;19(1):23-35. DOI 10.17816/ecogen50176 (in Russian)]
- Ильинов А.А., Раевский Б.В. Микросателлитные локусы в генетической оценке плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. *Изв. вузов. Лесн. журн.* 2023;3:48-68. DOI 10.37482/0536-1036-2023-3-48-68 [Ilinov A.A., Raevsky B.V. Genetic evaluation by microsatellite loci of *Pinus sylvestris* L. plus trees. *Lesnoy Zhurnal* = *Russian Forestry Journal*. 2023;3:48-68. DOI 10.37482/0536-1036-2023-3-48-68 (in Russian)]
- Камалов Р.М., Петюренко М.Ю., Дегтярева А.П. Изменчивость показателей молекулярных маркеров у клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. *Труды С.-Петерб. науч.-исслед. ин-та лесн. хоз-ва*. 2022;3:4-14. DOI 10.21178/2079-6080.2022.3.4 [Kamalov R.M., Peturenko M.Yu., Degtyareva A.P. Variability of indicators of molecular markers in clones of plus trees *Pinus sylvestris* L. *Trudy Sankt-Petersburgskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Lesnogo Khozyaystva* = *Proceedings of the Saint Peters-*

- burg Forestry Research Institute. 2022;3:4-14. DOI 10.21178/2079-6080.2022.3.4 (in Russian)]
- Милютин Т.Н., Шейкина О.В., Новиков П.С. Молекулярно-генетические исследования изменчивости клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* по ISSR-маркерам. *Хвойные бореальной зоны*. 2013;31(1-2):102-105  
[Milyutina T.N., Sheikina O.V., Novikov P.S. Molecular-genetic research of variation in clonal progeny of *Pinus sylvestris* plus trees using ISSR markers. *Khvoynye Boreal'noy Zony = Conifers of the Boreal Area*. 2013;31(1-2):102-105 (in Russian)]
- Пришневская Я.В., Нассонова Е.С., Чертов Н.В., Жуланов А.А., Васильева Ю.С., Боронникова С.В., Календарь Р.Н. Внутривидовое генетическое разнообразие популяций двух видов древесных растений Пермского края. *Бюл. науки и практики*. 2019;5(4):58-68. DOI 10.33619/2414-2948/41/06  
[Prishnevskaya Ya.V., Nasonova E.S., Chertov N.V., Zhulanov A.A., Vasileva Yu.S., Boronnikova S.V., Kalendar R.N. Genetic diversity within species of two species woody plants populations in Perm Krai. *Bulleten Nauki i Praktiki = Bulletin of Science and Practice*. 2019;5(4):58-68. DOI 10.33619/2414-2948/41/06 (in Russian)]
- Санников С.Н., Петрова И.В., Егоров Е.В., Санникова Н.С. Поиск и выявление системы плейстоценовых рефугиумов вида *Pinus sylvestris* L. *Экология*. 2020;3:181-189. DOI 10.31857/S0367059720030130  
[Sannikov S.N., Petrova I.V., Egorov E.V., Sannikova N.S. Searching for and revealing the system of pleistocene refugia for the species *Pinus sylvestris* L. *Russ. J. Ecol.* 2020;51(3):215-223. DOI 10.1134/S1067413620030133]
- Тараканов В.В., Кальченко Л.И. Фенетический анализ клоновых и естественных популяций сосны в Алтайском крае. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2015  
[Tarakanov V.V., Kalchenko L.I. Phenetic Analysis of Clonal and Natural Populations of *Pinus sylvestris* L. in the Altai Territory. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2015 (in Russian)]
- Тараканов В.В., Паленова М.М., Паркина О.В., Роговцев Р.В., Третьякова Р.А. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор). *Лесохозяйственная информация*. 2021;1:100-143. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2021.1.09  
[Tarakanov V.V., Palenova M.M., Parkina O.V., Rogovtsev R.V., Tretyakova R.A. Forest tree breeding in Russia: achievements, challenges, priorities (review). *Lesokhozyastvennaya Informatsiya = Forestry Information*. 2021;1:100-143. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2021.1.09 (in Russian)]
- Царев А.П., Лаур Н.В., Царев В.А., Царева Р.П. Современное состояние лесной селекции в Российской Федерации: тренд последних десятилетий. *Изв. вузов. Лесн. журн.* 2021;6:38-55. DOI 10.37482/0536-1036-2021-6-38-55  
[Tsarev A.P., Laur N.V., Tsarev V.A., Tsareva R.P. The current state of forest breeding in the Russian Federation: the trend of recent decades. *Lesnoy Zhurnal = Russian Forestry Journal*. 2021;6:38-55. DOI 10.37482/0536-1036-2021-6-38-55 (in Russian)]
- Шейкина О.В. Генетическая структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье. *Экол. генетика*. 2022а;20(4):261-270. DOI 10.17816/ecogen110866  
[Sheikina O.V. Genetic structure and differentiation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in the Middle and Upper Volga Regions. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2022а;20(4):261-270. DOI 10.17816/ecogen110866 (in Russian)]
- Шейкина О.В. Применение молекулярных маркеров в лесном селекционном семеноводстве в России: опыт и перспективы (обзор). *Вестн. Поволж. гос. технол. ун-та. Сер.: Лес. Экология. Природопользование*. 2022б;2(54):64-79. DOI 10.25686/2306-2827.2022.2.64  
[Sheikina O.V. Application of molecular markers in forest breeding and seed production in Russia: experience and prospects (review). *Vestnik Povolzhskogo Gosudarstvennogo Tekhnologicheskogo Universiteta. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopolzovanie = Vestnik of Volga State University of Technology. Series: Forest. Ecology. Nature Management*. 2022б;2(54):64-79. DOI 10.25686/2306-2827.2022.2.64 (in Russian)]
- Шигапов З.Х. Сравнительный генетический анализ лесосеменных плантаций и природных популяций сосны обыкновенной. *Лесоведение*. 1995;3:19-24  
[Shigapov Z.H. Comparative genetic analysis of forest seed plantations and natural populations of Scots pine. *Lesovedenie = Russian Journal of Forest Science*. 1995;3:19-24 (in Russian)]
- Bergman F., Ruetz W. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. *For. Ecol. Manag.* 1991;46(1-2):39-47. DOI 10.1016/0378-1127(91)90243-0
- Chertov N., Nechaeva Y., Zhulanov A., Pystogova N., Danilova M., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic structure of *Pinus* populations in the Urals. *Forests*. 2022;13(8):1278. DOI 10.3390/f13081278
- Cipriano J., Carvalho A., Fernandes C., Gaspar M.J., Pires J., Bento J., Roxo L., Louzada J., Lima-Brito J. Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *J. Genet.* 2013;92(2):e41-e48. DOI 10.1007/s12041-013-0241-3
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19:11-15
- Hosius B., Leinemann L., Konner M., Bergmann F. Genetic aspects of forestry in the Central Europe. *Eur. J. For. Res.* 2006;125(4):407-417. DOI 10.1007/s10342-006-0136-4
- Hui-yu L., Jing J., Gui-feng L., Xu-jun M., Jing-xiang D., Shi-lie L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. *J. For. Res.* 2005;16(3):216-218. DOI 10.1007/BF02856818
- Khanova E., Konovalov V., Timeryanov A., Isyanyulova R., Rafikova N. Genetic and selection assessment of the scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in forest seed orchards. *Wood Res.* 2020;65(2):283-292. DOI 10.37763/wr.1336-4561/65.2.283292
- Koelwijn H.P., Koski V., Savolainen O. Magnitude and timing of inbreeding depression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Evolution*. 1999;53(3):758-768. DOI 10.1111/j.1558-5646.1999.tb05370.x
- Peakall R., Smouse P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460
- Sboeva Y., Chertov N., Nechaeva Y., Valeeva A., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic diversity, structure, and differentiation of *Pinus sylvestris* L. populations in the East European Plain and the Middle Urals. *Forests*. 2022;13(11):1798. DOI 10.3390/f13111798
- Takezaki N., Nei M., Tamura K. POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Mol. Biol. Evol.* 2014;31(6):1622-1624. DOI 10.1093/molbev/msu093
- Vasilyeva Y., Chertov N., Nechaeva Y., Sboeva Y., Pystogova N., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic structure, differentiation and originality of *Pinus sylvestris* L. populations in the East of the East European Plain. *Forests*. 2021;12(8):999. DOI 10.3390/f12080999

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-16-00220 (<https://rscf.ru/project/23-16-00220/>) с использованием оборудования ЦКП «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.02.2023. После доработки 29.09.2023. Принята к публикации 29.09.2023.