

УДК 630\*232.311.3

*Т. Н. Криворотова, О. В. Шейкина*

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЛЕСОСЕМЕННЫХ ПЛАНТАЦИЙ И НАСАЖДЕНИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В СРЕДНЕМ ПОВОЛЖЬЕ

*Проведены сравнительные исследования генетической структуры лесосеменных плантаций и насаждений сосны обыкновенной на основе анализа ISSR-фрагментов ДНК. Установлено, что лесосеменные плантации имеют уровень генетической изменчивости не ниже чем сформированные в природе насаждения. Изученные лесосеменные плантации и насаждения не отличаются большой генетической дифференциацией, и основная доля генетической изменчивости находится внутри изученных групп деревьев (87,3 %).*

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris; лесосеменные плантации; насаждения; генетическая структура; ISSR-маркеры.*

**Введение.** Сохранение и воспроизводство биологического разнообразия является крайне актуальной задачей современного мира и занимает особое место среди глобальных проблем современности [1, 2]. Важнейшим фактором сокращения биоразнообразия является нерациональная хозяйственная деятельность без учёта структуры внутривидовой изменчивости и генетической подразделённости видов. Отрицательные последствия возникают не только при использовании биологических ресурсов, но и при проведении работ по их воспроизводству. Следовательно, одним из главных принципов неистощительного природопользования должно быть максимальное сохранение генетического разнообразия в процессе их использования и искусственного воспроизводства.

Традиционные методы лесной селекции, используемые при создании искусственных насаждений, базируются на отборе лучших по продуктивности растений на основе морфологических признаков,

при этом генетическая компонента не учитывается. Селекционные работы по созданию искусственных насаждений без учёта генетических характеристик могут приводить к потерям их генетического разнообразия. Снижение генетического разнообразия может происходить из-за того, что используется ограниченное число плюсовых деревьев при создании лесосеменных плантаций, а также из-за неравного распространения гамет клонами, отличающимися по урожайности [3]. М.У. Stoehr и У.А. El-Kassaby выделяют несколько шагов в селекции древесных видов, во время которых может быть снижен уровень генетической изменчивости, если не быть достаточно осторожными [4]. Это этап отбора по фенотипу, разные циклы селекции, получение семян и сеянцев. На всех этапах селекционного процесса должен выполняться систематически мониторинг [5]. Для решения данного вопроса, в том числе, необходимы генетические исследования созданных лесосеменных плантаций и сравнение получен-

---

© Криворотова Т. Н., Шейкина О. В., 2014.

Ссылка на статью: Криворотова Т. Н., Шейкина О. В. Генетическая структура лесосеменных плантаций и насаждений сосны обыкновенной в Среднем Поволжье // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 1(21). – С. 77-86.

ных данных с параметрами генетического разнообразия сформированных в природе популяций, которые могут рассматриваться как альтернативный источник семян.

С использованием молекулярно-генетических маркеров были проведены ряд исследований по оценке влияния селекционных мероприятий на уровень генетического разнообразия. В частности, некоторыми исследователями было показано, что отбор по фенотипу не приводит к значительному снижению генетического разнообразия на лесосеменных плантациях, где уровень генетической изменчивости близкий или даже превышает показатели, характерные для природных популяций [6–13]. Так, например, исследования сосны обыкновенной по 15 изоферментным локусам в Беларуси показали, что величина наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) почти не отличается на плантациях и в природных популяциях и равняется 0,314 и 0,321 соответственно [14]. В то же время было установлено, что на лесосеменных плантациях ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ ) меньше, чем в природных популяциях (0,303 и 0,237 соответственно) и это может указывать на потерю некоторого количества изменчивости при искусственном отборе. В работе З. Х. Шигапова показано, что на лесосеменных плантациях сосны обыкновенной с числом клонов менее 50 не сохраняется разнообразие природных популяций [15]. При этом выявлено существенное увеличение общего генетического разнообразия лесосеменных плантаций при использовании нескольких сот клонов.

Необходимо отметить, что упомянутые выше исследования были проведены в основном на основе использования изоферментных маркеров, которые отражают только изменчивость в ограниченных кодирующих участках ДНК. Однако с развитием научного прогресса появился новый класс молекулярно-генетических маркеров, так называемые ДНК-маркеры, которые позволяют выявлять изменчи-

вость в разных участках генома. Мировая практика показывает, что использование различных видов ДНК-маркеров позволяет решать многие задачи при исследовании древесных видов [16–21], в том числе проводить оценку уровня генетической изменчивости плюсовых деревьев [22, 23].

**Цель** работы заключается в проведении исследований по оценке уровня генетического разнообразия сосны обыкновенной на лесосеменных плантациях и в насаждениях из разных районов Среднего Поволжья на основе анализа изменчивости ISSR-фрагментов ДНК.

Для реализации сформулированной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1) изучить генетическую структуру лесосеменных плантаций первого порядка из трёх географических районов;

2) изучить генетическую структуру спелых и приспевающих насаждений сосны обыкновенной из тех же географических районов;

3) провести сравнительный анализ генетической изменчивости деревьев на лесосеменных плантациях и в природных популяциях.

#### **Объекты и методы исследований.**

Объектами исследований являлись лесосеменные плантации 1 порядка (ЛСП), спелые и приспевающие насаждения сосны обыкновенной из Республики Марий Эл, Чувашской Республики и Пензенской области. Отобрано и проанализировано около 200 деревьев сосны обыкновенной.

В качестве исходного материала для экстракции ДНК использовали хвою с клонов плюсовых деревьев на лесосеменной плантации и древесину, собранную со случайных деревьев в насаждениях. Выделение ДНК осуществлялось по методу J.J. Doyle и J.L. Doyle с применением  $2 \times$ СТАВ-буфера [24]. Для изучения генетической структуры ЛСП и насаждений использовали шесть ISSR-праймеров, которые характеризуются высоким полиморфизмом и отличаются отчётливыми идентифицируемыми полосами:  $(CA)_6AGCT$ ,

(CA)<sub>6</sub>AGG, (CA)<sub>6</sub>GT, (CA)<sub>6</sub>AC, (AG)<sub>8</sub>T, (AG)<sub>8</sub>GCT.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в тонкостенных пробирках на амплификаторе MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD). Для проведения ПЦР был использован набор реактивов Encyclo PCR kit («Евроген», Россия). Состав смеси для полимеразной цепной реакции: 0,1 мкл Taq полимеразы; 1 мкл ДНК-матрицы; 0,1 мкл праймера; 0,2 мкл dNTPs; 1 мкл буфера и добавляли стерильную воду 7,6 мкл. Режим полимеразной цепной реакции: 5 мин. предварительная денатурация при 94°C; 45 циклов – 0,5 мин. денатурация при 94°C, 45 сек. отжиг (60–65°C), 2 мин. элонгация при 72°C; окончательная элонгация 7 мин 72°C.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в горизонтальной электрофоретической камере в 1,5 % агарозном геле, с добавлением этидия бромиды при напряжении 70 V в течение 2–2,5 часов.

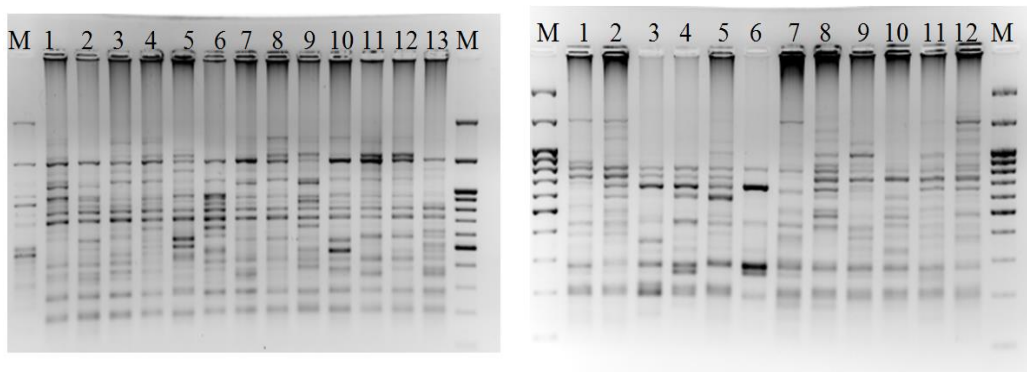
Визуализацию ДНК, обработку и анализ полученных изображений проводили с помощью системы гель-документации GelDoc 2000 (BIO-RAD) с использованием программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. Наличие амплифицированных фрагментов ДНК в гелях устанавливали по интенсивности окраски, оценивали только чёткие и воспроизводимые полосы. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы 100 bp +1,5 + 3,000 kb, производство СибЭнзим (Россия). Для количественной оценки степени полиморфизма и определения уровня дивергенции между изучаемыми объектами полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие полос на геле рассматривались соответственно, как состояние 1 или 0. Для создания матрицы использовали программу BioImage Geles PCR Analysis v.1.0. Определение уровня изменчивости и дифференциации произво-

дится путём вычисления генетических параметров, характеризующих исследуемую совокупность. Для расчёта генетических параметров использовали специализированную программу POPGENE Version 1.32., позволяющую выполнять расчёт следующих генетических параметров: долю полиморфных локусов, наблюдаемое число аллелей ( $n_a$ ), эффективного числа аллелей ( $n_e$ ), генетическое разнообразие по Нею (H), информационного индекса Шеннона (I) [25–28].

**Результаты и обсуждение.** Для обеспечения высокого уровня генетического разнообразия используемых для лесовосстановления семян важно, чтобы на лесосеменных плантациях был достаточно высокий запас генетической изменчивости. Оценка уровня генетической изменчивости ЛСП проводится в сравнении с приспевающими и спелыми сосновыми насаждениями, сформированными в тех же географических районах и которые могут рассматриваться как альтернативный источник семян для лесовосстановления.

По результатам ISSR-анализа ДНК, выделенной из хвои клонов плюсовых деревьев с ЛСП и древесины насаждений, было установлено, что шесть ISSR-праймеров выявляют всего 215 амплифицированных фрагментов ДНК, при этом число обнаруженных при электрофорезе фрагментов ДНК у разных праймеров варьирует от 27 (у (AG)<sub>8</sub>T) до 40 (у (CA)<sub>6</sub>AGG и (AG)<sub>8</sub>GCT). Размеры ампликонов варьировали от 200 до 2500 пар нуклеотидов. Пример электрофоретического разделения продуктов амплификации с использованием праймера (CA)<sub>6</sub>AC приведен на рис. 1.

После обработки полученных электрофореграмм были рассчитаны частоты встречаемости аллелей обнаруженных локусов. Полученные частоты ISSR-фрагментов использовались для оценки основных параметров генетической изменчивости клонов плюсовых деревьев и насаждений сосны обыкновенной.



А

Б

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ISSR-PCR анализа ДНК сосны обыкновенной с праймером (СА)6AC: 1-13 – номера образцов ДНК, М – маркер молекулярных размеров (СибЭнзим, 100 bp + 3,0 kb): А – электрофореграммы продуктов ПЦР клонов плюсовых деревьев с ЛСП, Б – электрофореграммы продуктов ПЦР сосновых насаждений

Результаты исследований показали, что доля полиморфных локусов у всех изученных деревьев сосны обыкновенной составила 97,2 %, при этом у ЛСП данный показатель варьировал от 81,4 до 91,2 %, а у насаждений – от 77,2 до 88,8 % (табл. 1). Доля полиморфных локусов отдельно для всех лесосеменных плантаций и насаждений имела близкое к видовому уровню значение, так, для всех ЛСП данный показатель равнялся

96,7 и для всех насаждений 95,8 %.

Изученные лесосеменные плантации и насаждения не существенно отличаются по наблюдаемому и эффективному числу аллелей. Для лесосеменных плантаций наблюдаемое число аллелей варьирует от 1,814 до 1,912, в то время как в насаждениях от 1,772 до 1,888. Размах значений эффективного числа аллелей составил для лесосеменных плантаций 1,340 – 1,455, а для насаждений – 1,332 – 1,382.

Таблица 1

Основные показатели генетической изменчивости ЛСП и насаждений сосны обыкновенной из разных географических районов

Район и объект	Параметры генетической изменчивости				
	доля полиморфных локусов, Р, %	наблюдаемое число аллелей, Na	эффективное число аллелей, Ne	генетическое разнообразие по Нею, H	индекс Шеннона, I
Республика Марий Эл (РМЭ)					
ЛСП	83,3	1,833	1,340	0,212	0,334
насаждение	77,2	1,772	1,332	0,207	0,325
Чувашская Республика (ЧР)					
ЛСП	91,2	1,912	1,455	0,278	0,426
насаждение	88,8	1,888	1,362	0,230	0,364
Пензенская область (ПО)					
ЛСП	81,4	1,814	1,376	0,231	0,358
насаждение	86,1	1,861	1,382	0,238	0,372
В целом для ЛСП	96,7	1,967	1,427	0,266	0,416
В целом для насаждений	95,8	1,958	1,398	0,254	0,401
В целом для вида	97,2	1,972	1,426	0,266	0,417

Наивысшее значение генетического разнообразия по Нею и информационного индекса Шеннона характерно для лесосеменной плантации в Чувашской Республике (0,278 и 0,426 соответственно), для сосновых насаждений этой же республики эти показатели оказались значительно ниже и составили 0,230 и 0,364 соответственно. В двух других регионах у лесосеменных плантаций и насаждений данные показатели оказались близкими. Так, в Республике Марий Эл генетическое разнообразие по Нею составило 0,212 и 0,207, а индекс Шеннона – 0,334 и 0,325 соответственно на ЛСП и в насаждениях. В Пензенской области генетическое разнообразие по Нею составило 0,231 и 0,238, а индекс Шеннона – 0,358 и 0,372 соответственно на ЛСП и в насаждениях.

В целом для всех ЛСП общее генетическое разнообразие и индекс Шеннона составили 0,266 и 0,416 соответственно, что является достаточно высоким показателем. Обобщённые показатели для насаждений составили 0,254 и 0,401, что несколько ниже данных показателей для ЛСП. Необходимо отметить, что обобщённые показатели для лесосеменных плантаций и насаждений оказались достаточно близкими к показателям, установленным для всех изученных образцов, которые составили 0,266 и 0,417.

Таким образом, сравнительный анализ значений основных параметров, ха-

рактеризующих уровень генетической изменчивости вычисленных на основе анализа ISSR-фрагментов ДНК, показал, что генетическое разнообразие лесосеменных плантаций не только не уступает, но и в двух из трёх случаях (в Республике Марий и Чувашской Республике) превосходит уровень, установленный для насаждений из тех же географических регионов. Так же в целом изменчивость отобранных плюсовых деревьев, использованных при создании лесосеменных плантаций, сопоставима с уровнем изменчивости, выявленной у вида в районе проведения эксперимента. Это может свидетельствовать о том, что использование семян с лесосеменных плантаций для лесовосстановления позволит обеспечить сохранение и воспроизводство генетического разнообразия сосны обыкновенной.

На основе шести ISSR-праймеров так же была проанализирована генетическая дистанция между изученными объектами. Данный показатель варьирует от 0,011 до 0,079, при этом наиболее генетически близкими являются ЛСП и насаждения из Пензенской области, а наиболее генетически дифференцированными – насаждения из Республики Марий Эл и объекты из Пензенской области (табл. 2).

Дифференциацию популяций и генетическое взаимоотношение иллюстрирует дендрограмма, построенная на основе рассчитанной генетической дистанции (рис. 2).

Таблица 2

**Генетическая дистанция Нея (под диагональю) и генетическая идентичность (над диагональю) лесосеменных плантаций и насаждений из разных регионов Среднего Поволжья**

Регион и объект		ПО		РМЭ		ЧР	
		ЛСП	насаждение	ЛСП	насаждение	ЛСП	насаждение
ПО	ЛСП		0,989	0,949	0,925	0,943	0,946
	насаждение	0,011		0,945	0,924	0,943	0,947
РМЭ	ЛСП	0,052	0,056		0,937	0,959	0,949
	насаждение	0,079	0,079	0,065		0,939	0,956
ЧР	ЛСП	0,059	0,059	0,042	0,063		0,963
	насаждение	0,054	0,054	0,052	0,046	0,038	

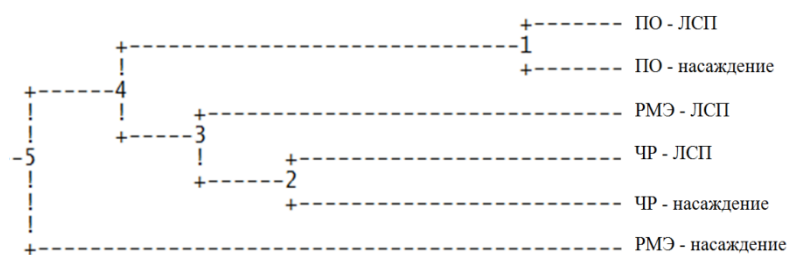


Рис. 2. Дендрограмма генетических взаимоотношений лесосеменных плантаций и насаждений из разных районов Среднего Поволжья

На дендрограмме чётко видно, что насаждение из Республики Марий Эл генетически дифференцировано от других изученных объектов и именно у данного насаждения было выявлено самое низкое генетическое разнообразие.

Расчётный показатель доли межпопуляционного разнообразия ( $G_{st}$ ) составил 0,127. Это свидетельствует о том, что на долю межпопуляционной изменчивости приходится всего 12,7 % от всей генетической изменчивости и около 87,3 % приходится на изменчивость деревьев в пределах изученных объектов. Этот показатель отражает «баланс» процессов, вызывающих дифференциацию и интеграцию генофондов из разных популяций. Как правило, значения  $G_{st}$  выше у удалённых друг от друга популяций и для популяций видов с высокой частотой сымоопыления. Для сосны обыкновенной вполне ожидаемо, что степень генетической подразделённости изученных объектов будет незначительная, так как этот вид ветроопыляемый, и пыльца благодаря наличию воздушных мешков может распространяться на значительные расстояния. О наличии прямого обмена генами также свидетельствует величина генного потока ( $N_m$ ), которая составила 3,45 мигранта на поколение.

Полученные данные о низкой генетической дифференциации смежных популяций сосны обыкновенной согласуются с результатами других исследований, в которых была показана низкая внутривидовая дифференциация близко расположен-

ных популяций сосны [15, 29, 30]. Достаточно большие генетические различия у популяций сосны обыкновенной наблюдаются только на больших расстояниях или в контрастных условиях, как, например, горные и пустынные популяции [18].

Сравнение генетических параметров лесосеменных плантаций и насаждений из Республики Марий Эл, Чувашской Республики и Пензенской области позволяет сделать следующие **выводы**:

1) установлено, что уровень генетического разнообразия у лесосеменных плантаций в Пензенской области, Республике Марий Эл и Чувашской Республике, оцениваемый на основе анализа ISSR-фрагментов ДНК, не уступает уровню генетического разнообразия, выявленному в насаждениях из данных регионов. Так, доля полиморфных локусов на ЛСП изменялась от 81,4 до 91,2 %, а у насаждений – от 77,2 до 88,8 %; число наблюдаемых аллелей – от 1,814 до 1,912 и от 1,772 до 1,888 соответственно на ЛСП и в насаждениях; эффективное число аллелей от 1,340 до 1,455 и от 1,332 до 1,382 соответственно на ЛСП и в насаждениях; генетическое разнообразие по Нею – от 0,212 до 0,278 и от 0,207 до 0,238 соответственно на ЛСП и в насаждениях; индекс Шеннона – от 0,334 до 0,426 и от 0,325 до 0,372 соответственно на ЛСП и в насаждениях;

2) в целом для всех объектов получены следующие параметры генетической изменчивости: полиморфизм – 97,2 %, число наблюдаемых аллелей – 1,972, чис-

ло эффективных аллелей – 1,426, генетическое разнообразие по Нею – 0,266 и индекс Шеннона 0,417. Ни для одного ЛСП или насаждения не были установлены значения генетических параметров, характерные для вида в районе проведения эксперимента. Только при включении в одну выборку всех ЛСП рассчитанные показатели генетической изменчивости стали сравнимыми с общевидовым уровнем ( $P=96,7\%$ ;  $N_a=1,967$ ;  $N_e=1,427$ ;  $H=0,266$ ;  $I=0,416$ );

3) показатель доли межпопуляционного разнообразия ( $G_{st}=0,127$ ) и величина генного потока ( $N_m=3,45$ ) свидетель-

ствуют о незначительной изолированности сосны обыкновенной в изученных регионах Среднего Поволжья, что вполне ожидаемо в связи с особенностями системы размножения вида (ветроопыляемый вид, у которого пыльца легко распространяется на дальние расстояния). В то же время было установлено, что насаждение из Республики Марий несколько дифференцировано от других изученных, что, вероятно, объясняется тем, что именно для этого насаждения были определены самые низкие значения параметров генетической изменчивости ( $P=77,2\%$ ;  $N_a=1,772$ ;  $N_e=1,332$ ;  $H=0,207$ ;  $I=0,325$ ).

**Работа выполнена в рамках Государственного задания высшим учебным заведениям на 2014 год «Изучение внутривидового полиморфизма сосны обыкновенной с использованием ISSR-маркеров».**

#### Список литературы

1. Конвенция о биологическом разнообразии. Электронный ресурс. Рио-де-Жанейро, 1992. [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml). (дата обращения: 25.05.2013).
2. Алтухов, Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях / Ю.П. Алтухов // Вестник ВОГиС. – 2004. – Вып. 8, № 2. – С. 40-59.
3. Harju, A. Genetic functioning of Scots pine seed orchards / A. Harju. – Acta Universitatis Ouluensis. – Finland: University of Oulu, 1995. – 271 p.
4. Stoehr, M.U. Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia / M.U. Stoehr and Y.A. El-Kassaby // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – Vol. 94, Iss. 1. – P. 83-90.
5. El-Kassaby, Y.A. Genetic diversity of forest tree plantations: consequences of domestication / Y.A. El-Kassaby and G. Namkoong // Consequences of changes in biodiversity. IUFRO World Congress, Tampere, Finland. – 1995. – Vol. 2. – P.218-228.
6. Knowles, P. Comparison of isozyme variation among natural stands and plantations: jack pine and black spruce / P. Knowles // Canadian Journal of Forest Research. – 1985. – 1 Vol. 5. – P. 902-908.
7. Cheliak, W.M. Genetic effects of phenotypic selection in white spruce / Cheliak W.M., G. Murray and J.A. Pitel // Forest Ecology and Management. – 1988. – Vol. 24, Iss. 2. – P. 139-149.
8. Bergman, F. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations / F. Bergman and W. Ruetz // Forest Ecology and Management. – 1991. – Vol. 46, Iss. 1-2. – P. 39-47.
9. Chaisurisri, K. Genetic diversity in a seed production population and natural population of Sitka spruce / K. Chaisurisri and Y.A. El-Kassaby // Biodiversity & Conservation. – 1994. – Vol. 3, Iss. 6. – P. 512-523.
10. Williams, C.G. Multiple-population versus hierarchical conifer breeding programs: a comparison of genetic diversity levels. / C.G. Williams, J.L. Hamrick and P.O. Lewis // Theoretical and Applied Genetics. – 1995. – Vol. 90, Iss. 3-4. – P. 584-594.
11. Adams, W. T. Population genetics and gene conservation in pacific northwest conifers / W. T. Adams // Evolution Today. Proceedings of the Second International Congress of Systematic and Evolutionary Biology. – Hunt Institute for Botanical Documentation: Carnegie-Mellon University, 1981. – P. 401-415.
12. Siregar, I.Z. Patterns of genetic structure and variation of Merkus pine (*Pinus merkusii*) in Indonesia / I.Z. Siregar, H.H. Hattermer // Journal of Tropical Forest Science. – 2004. – Vol. 16. – P. 160-172.
13. Savolainen, O. Effect of forest management on gene pools. / O. Savolainen and K. Kärkkäinen // New Forests. – 1992. – Vol. 6, Iss. 1-4. – P. 326-345.
14. Гончаренко, В.Е. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов, В.В. Потенко. – Гомель: Белорусский научно-исследовательский институт лесного хозяйства, 1989. – 163 с.

15. *Шигапов, З.Х.* Внутривидовая изменчивость и дифференциация видов семейства Pinaceae на Урале: автореф. дисс. .... д-ра биол. наук: 03.00.05 / Зинур Хайдарович Шигапов. – Пермь, 2005. – 42 с.
16. *Alden, J.* Genetic diversity and population structure of *Picea glauca* on an altitudinal gradient in interior Alaska / J. Alden, C. Loopstra // Canadian Journal of Forest Research. – 1987. – Vol. 17. – P. 1519–1526.
17. *Rajora, O.P.* Genetic diversity and population structure of disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus*) / O.P. Rajora, L. DeVerno, A. Mosseler, DJ Am. Innes // Canadian Journal of Botany. – 1998. – Vol. 76. – P. 500–508.
18. *Hui-yu, Li* Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers / Li Hui-yu, Jing Jing, Liu Gui-feng, Ma Xu-jun, Dong Jing-xiang, Lin Shi-jie // Journal of Forest Research. – 2005. – Vol. 16, No 3. – P. 216–218.
19. *Ranger, M.* Genetic Differentiation of Jack Pine (*Pinus banksiana*) and Red Pine (*P. resinosa*) Populations From Metal Contaminated Areas in Northern Ontario (Canada) Using ISSR Markers / M. Ranger, K. K. Nkongolo, P. Michael, P. Beckett // Silvae Genetica. – 2008. – Vol. 57, No 6. – P. 333 – 340.
20. *Varsha, A.P.* Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances / A. Parasharami Varsha, R. Thengane Shubhada // International Journal of Biodiversity and Conservation. – 2012. – Vol. 4, No 5. – P. 219–227.
21. *Rubio-Moraga A.* Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles / A. Rubio-Moraga, D. Candel-Perez, M.E. Lucas-Borja, P.A. Tiscar, B. Viñepla, J.C. Linares, L. Gómez-Gómez, O. Ahrazem // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13, No 5. – P. 5645–58.
22. *Шейкина, О. В.* Исследования генетической изменчивости плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* ISSR-маркерами / О.В. Шейкина, П.С. Новиков, Т.Н. Милютин // VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития»: материалы VI Московского международного конгресса, часть 1 (Москва, 21–25 марта, 2011 г.). – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2011 – С. 292.
23. *Новиков, П.С.* Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной на архиве клонов по ISSR-маркерам / П.С. Новиков, О.В. Шейкина, Т.Н. Милютин // Вестник Марийского государственного технического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2011. – № 3. – С. 82–87.
24. *Doyle, J.J.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochemical Bulletin. – 1991. – Vol. 19. – P. 11–15.
25. *Yeh, F.C.* POPGENE Version 1.32: Microsoft Windows – based freeware for genetic analysis , quick user guide / F.C. Yeh, R. Yang, T. Boyle. – Edmonton: University of Alberta Center for International Forestry Research, 1997. – 28 p
26. *Kimura, M.* The number of alleles that can be maintained in a finite population / M. Kimura, J.F. Crow // Genetics (US). – 1964. – Vol. 49. – P. 725–738.
27. *Nei, M.* Genetic distance between populations/ M. Nei // The American Naturalist. – 1972. – Vol. 106. – P. 283 - 292.
28. *Schannon, C.E.* The mathematical theory of communication Urbana / C.E. Schannon, W. Weaver // Univ. of Illinois Press. – 1949. – 284 p.
29. *Li Bin.* Review on genetic diversity in *Pinus* (J)/ Li Bin, Gu Wanchun // Hereditas. – 2003. – Vol. 25, No 6. – P. 740–748.
30. *Абдуллина, Д. С.* Феногенеогеографический анализ структуры и дифференциации популяций сосны обыкновенной в Якутии: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 2009. – 48 с.

Статья поступила в редакцию 10.06.13.

*КРИВОРОТОВА Татьяна Николаевна* – ассистент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет (Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 3). Область научных интересов – селекция сосны обыкновенной, использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве. Автор 20 публикаций.

E-mail: Milutina\_tanja@mail.ru

*ШЕЙКИНА Ольга Викторовна* – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, Поволжский государственный технологический университет (Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 3). Область научных интересов – молекулярно-генетические исследования древесных видов, использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве, селекция древесных видов. Автор 34 публикаций.

E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net



*KRIVOROTOVA Tatiana Nikolayevna* – Assistant at the Chair of Forest Selection, Noon-Woody Resources and Biotechnologies, Volga State University of Technology (3, Pl. Lenina, Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation). Research interest – selection of *Pinus sylvestris*, use of DNA methods in forest seed growing. The author of 20 publications.

E-mail: Milutina\_tanja@mail.ru

*SHEIKINA Olga Viktorovna* – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor at the Chair of Forest Selection, Noon-Woody Resources and Biotechnologies, Volga State University of Technology (3, Pl. Lenina, Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation). Research interests – molecular-genetic researches of forest species, use of DNA methods in forest seed growing, selection of forest species. The author of 34 publications.

E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net

*T. N. Krivorotova, O. V. Sheikina*

### GENETIC STRUCTURE OF SEED ORCHARDS AND NATURAL STANDS OF PINUS SYLVESTRIS IN THE MIDDLE VOLGA REGION

**Key words:** *Pinus sylvestris*; seed orchards; stands; genetic structure; ISSR markers.

#### ABSTRACT

*Genetic diversity is one of the factors providing sustainable development of forest ecosystems. Therefore, reproduction of genetic variation in the course of breeding programs implementation and artificial reforestation is an important problem. The goal of this research is to study and compare genetic structure of seed orchards, created to supply seeds for artificial reforestation, and the natural stands serving as an alternative source of seed. The seed orchards and the stands originating from the Republic of Mari El, Chuvash Republic and Penza oblast were studied in this research. Estimation of the level of genetic variation and differentiation was carried out with the use of ISSR – DNA fragments. Six ISSR primers for performance of polymerase chain reaction (PCR) were used, it made it possible to amplify 215 DNA fragments. The results show that the level of genetic diversity in seed orchards compares well with the level of genetic diversity detected in natural stand from the same regions. For example, a share of polymorphic loci in the seed orchards varied from 81.4 to 91.2 %, at that time in the stands it was from 77.2 to 88.8 %. According to Nei, genetic diversity was from 0.12 to 0.278 in the seed orchards and from 0.207 to 0.238 in the stands. Measure of diversity part between populations ( $G_{st}=0.127$ ) and size of gene flow ( $Nm=3.45$ ) indicate low isolation of *Pinus sylvestris* in the studied regions of Middle Volga Region which is quite normal for propagation of this species.*

#### References

1. Konventsiya o biologicheskom raznoobrazii. [Convention about Bio-Diversity]. Rio de Janeiro, 1992. URL: [http://www.un.org/ru/documents/decl\\_conv/conventions/biodiv.shtml](http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml) (Reference date: 23.05.2013).
2. Altukhov Yu.P. Dinamika genofondov pri antropogennykh vozdeystviyakh [Dynamics of Genofonds in Case of Anthropogenic Impact]. *Vestnik VOGiS [Vestnik of VOGiS]*. 2004. Issue.8. No 2. P. 40-59.
3. Harju A. Genetic Functioning of Scots Pine Seed Orchards. Ph.D. thesis. Acta Universitatis Ouluensis. Finland: University of Oulu, 1995. 271 p.
4. Stoehr M.U., El-Kassaby Y.A. Levels of Genetic Diversity at Different Stages of Domestication Cycle of Interior Spruce in British Columbia. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997. Vol. 94. P. 83-90.
5. El-Kassaby Y.A., Namkoong G. Genetic Diversity of Forest Tree Plantations: Consequences of Domestication. Consequences of Changes in Biodiversity. IUFRO World Congress, Tampere, Finland. 1995. Vol. 2. P. 218-228.
6. Knowles P. Comparison of Isozyme Variation Among Natural Stands and Plantations: Jack Pine and Black Spruce. *Canadian Journal of Forest Research*. 1985. Vol. 15. P. 902-908.
7. Cheliak W.M., Murray G., Pitel, J.A. Genetic Effects of Phenotypic Selection in White Spruce. *Forest Ecology and Management*. 1988. Vol. 24. P. 139-149.
8. Bergman F., Ruetz W. Isozyme Genetic Variation and Heterozygosity in Random Tree Samples and Selected Orchard Clones from the Same Norway Spruce Populations. *Forest Ecology and Management*. 1991. Vol. 46, Iss. 1-2. P. 39-47.
9. Chaisurisri K., El-Kassaby Y.A. Genetic Diversity in Seed Production Population and Natural Population of Sitka Spruce. *Biodiversity & Conservation*. 1994. Vol. 3, Iss 6. – P. 512-523.

10. Williams C.G., Hamrick J.L., Lewis P.O. Multiple-Population Versus Hierarchical Conifer Breeding Programs: a Comparison of Genetic Diversity Levels. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995. Vol. 90, No 3-4. P. 584-594.
11. Adams, W. T. Population Genetics and Gene Conservation in Pacific Northwest Conifers. *Evolution Today, Proceedings of the Second International Congress of Systematic and Evolutionary Biology*. 1981. P. 401-415.
12. Siregar I.Z., Hattermer H.H. Patterns of Genetic Structure and Variation of Merkus Pine (*Pinus merkusii*) in Indonesia. *Journal of Tropical Forest Science*. 2004. Vol. 16. P. 160-172.
13. Savolainen O., Kärkkäinen K. Effect of Forest Management on Gene Pools. *New Forests*. 1992. Vol. 6. Iss. 1-4. P. 326-345.
14. Goncharenko G.G., Padutov V.E., Potenko V.V. Rukovodstvo po issledovaniyu khvoynykh vidov metodom elektroforeticheskogo analiza izofermentov [Instruction on Needle Species Research by the Method of Isozyme Analysis]. Gomel: Belorusskiy nauchno-issledovatel'skiy institut lesnogo khozyaystva [Belarusian Research Institute of Forestry]. 1989. 163 p.
15. Shigapov, Z.Kh. Vnutrividovaya izmenchivost i differentsiatsiya vidov semeystva Pinaceae na Urale Avtoref. Diss. dokt. biol. nauk [Interspecies Variation and Differentiation of Pinacea Species on the Ural. Dr. biol. sci. diss: 03.00.05.]. Perm, 2005. 42 p.
16. Alden J., Loopstra C. Genetic Diversity and Population Structure of *Picea glauca* on an Altitudinal Gradient in Interior Alaska. *Canadian Journal of Forest Research*. 1987. Vol. 17. P. 1519-1526.
17. Rajora O.P., DeVerno L., Mosseler A., Innes DJ Am. Genetic Diversity and Population Structure of Disjunct Newfoundland and Central Ontario Populations of Eastern White Pine (*Pinus strobus*). *Canadian Journal of Botany*. 1998. Vol. 76. P. 500-508.
18. Li Hui-yu, Jing Jing, Liu Gui-fmg, Ma Xu-jun, Dong Jing-xiang, Lin Shi-jie. Genetic Variation and Division of *Pinus sylvestris* Provenances by ISSR Markers. *Journal of Forest Research*. 2005. Vol.16, No 3. P. 216-218.
19. 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.
20. Varsha A.P., Shubhada R. T. Inter Population Genetic Diversity Analysis Using ISSR Markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian Provenances. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2012. Vol. 4, No 5. P. 219-227.
21. Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M.E., Tiscar P.A., Viñegla 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. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, No5. P. 5645-58.
22. Sheikina O.V., Novikov P.S., Milyutina T.N. Issledovaniya Geneticheskoy izmenchivosti plyusovykh derevev *Pinus sylvestris* ISSR-markeram [Genetic Variation Study of *Pinus sylvestris* Plus Trees by ISSR Markers.]. VI moskovskiy mezhdunarodnyy kongress «Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya»: materialy VI Moskovskogo mezhdunarodnogo kongressa, chast 1 (Moskva, 21-25 marta, 2011 g.) [VI Moscow International Congress «Biotechnology: State and Developing Perspective»: Materials of VI Moscow International Congress, Part 1 (Moscow, March, 21-25 2011)]. Moscow: ZAO «Ekspo-biokhim-tekhnologii», RKhTU im. D.I. Mendeleeva, 2011. P. 292.
23. Novikov P.S., Sheikina O.V., Milyutina T.N. Izmenchivost plyusovykh derevev sosny obyknovnoy na arkhive klonov po ISSR markeram [Variation of *Pinus sylvestris* Plus Trees on the Clone Archive by ISSR Markers]. *Vestnik Mariyskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Ser.: Les. Ekologiya. Prirodopolzovanie [Vestnik of Mari State Technical University. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management]*. 2011. No 3. P. 82-87.
24. Doyle J.J., Doyle J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1991. Vol. 19. P. 11-15.
25. Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE Version 1.32. Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Centre. Edmonton: University of Alberta Center for International Forestry Research, 1997. 27 p.
26. Kimura M., Crow J.F. The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics (US)*. 1964. Vol. 49. P. 725-738.
27. Nei, M. Genetic Distance Between Populations. *The American Naturalist*. 1972. Vol. 106. P. 283 - 292.
28. Shannon C.E., Weaver W. The Mathematical Theory of Communication Urbana . *Univ. of Illinois Press*. 1949. 284 p.
29. Li Bin, Gu Wanchun Review on Genetic Diversity in *Pinus* (J). *Hereditas*. 2003. Vol. 25, No 6. P. 740-748.
30. Abdullina D. S. Fenogenogeograficheskiy analiz struktury i differentsiatsii populyatsiy sosny obyknovnoy v Yakutii. Avtoref. Diss. dokt. biol. nauk [Phenogenetic and Geography Analysis of Structure and Differential Population of *Pinus sylvestris* in Yakutia. Autoref. Dr. tech. sci. diss.]. Ekaterinburg, 2009. 48 p.