

УДК 630.1 (575.22)

DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ИЗ СМЕЖНЫХ БОЛОТНОЙ И СУХОДОЛЬНОЙ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ ПО ЯДЕРНЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Ю. Ф. Гладков¹, О. В. Шейкина²

¹ Филиал ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл», Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, ул. Комсомольска, 83

² Поволжский государственный технологический университет, Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 3

E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net

*Приведены результаты изучения полиморфизма пяти микросателлитных локусов в смежных ценопопуляциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в контрастных почвенных условиях. Всего было выявлено 36 аллелей в болотной и 32 аллеля в суходольной ценопопуляции. Количество уникальных аллелей составило восемь и четыре соответственно. χ^2 -тест показал отсутствие достоверных отличий по частоте встречаемости аллелей в болотной и суходольной ценопопуляциях. Изученные ценопопуляции характеризовались близким уровнем генетической изменчивости. Дифференциация изученных ценопопуляций сосны обыкновенной по SSR-маркерам составила 1,2 % ($F_{ST}=0,012$).*

Ключевые слова: сосна обыкновенная; болотная и суходольная ценопопуляции; генетический полиморфизм; ядерные микросателлиты.

Введение. Лесные древесные виды часто занимают обширные ареалы, и поэтому климат считается одним из наиболее важных факторов, оказывающих влияние на формирование генетической структуры популяций лесных пород [1, 2]. Наряду с географическими градиентами, признаётся также важным понимание изменчивости популяций древесных видов, проявляющейся под воздействием эдафических факторов [3]. Эдафическая среда произрастания древесных популяций может быть гетерогенной в пределах небольшой территории, поэтому локальная адаптация может проявляться у популяций, произрастающих недалеко друг от друга в одних климатических условиях [4, 5].

Ряд исследований показывают, что в силу различий почвенно-экологических условий, в болотных и суходольных эко-

топах формируются насаждения сосны обыкновенной, отличающиеся по фенотипическим и генетическим признакам. Ранее были выявлены различия между деревьями из контрастных экотопов по морфологическим признакам маркостробил и микростробил [6, 7], качественным характеристикам семенного потомства [8], частоте встречаемости деревьев с разной окраской первого и третьего слоя семян, разной окраской шишек, микростробил и типов развития апофиза [9], особенностям кариотипа [10, 11], изменчивости аллозимов [12, 13, 14], полиморфизму ISSR-маркеров [15]. Было установлено, что различия в гидротермическом режиме почвы приводят к изменению сроков пыления и рецепции у деревьев сосны обыкновенной в условиях болотных и суходольных экотопов, что приводит к возникновению

© Гладков Ю. Ф., Шейкина О. В., 2019.

Для цитирования: Гладков Ю. Ф., Шейкина О. В. Генетический полиморфизм деревьев сосны обыкновенной из смежных болотной и суходольной ценопопуляций по ядерным микросателлитным локусам // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. 2019. № 4 (44). С. 70–79. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70

репродуктивной изоляции [16, 17]. К формированию отличающейся фенотипической и генетической структуры болотных и суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной также приводит дизруптивный отбор [16]. В целом, по мнению И.Д. Махаткова, В.В. Тараканова и В.М. Тюпиной [18], уровень генетической дивергенции популяций сосны из отличающихся эколого-эдафических условий может определяться сложным взаимодействием различных факторов и зависеть от возраста болотных экосистем.

Как показало изучение научной литературы, несмотря на проведенные для различных регионов исследования по выявлению роли экологических барьеров в формировании генетической структуры насаждений хвойных видов, использование современных высокоинформативных молекулярных маркеров, позволяющих выявлять генетическую изменчивость на уровне ДНК, оказалось весьма ограничено. В частности, анализ микросателлитных локусов у деревьев из болотных и суходольных ценопопуляций на территории нашей страны был выполнен только для кедра сибирского [19] и ели обыкновенной [20]. Между тем, микросателлиты, или SSR-маркеры (SSR – Simple Sequence Repeats – простые повторяющиеся последовательности), считаются самым стабильным, высокоинформативным и вос-

производимым типом ДНК-маркеров и поэтому в последние годы SSR-маркеры весьма востребованы в популяционно-генетических исследованиях хвойных видов в России и за рубежом [21].

Цель работы заключалась в сравнительной оценке уровня генетического полиморфизма и выявлении особенностей генетической структуры болотных и суходольных ценопопуляций на основе анализа изменчивости микросателлитных регионов ядерной ДНК.

Объекты и методика исследований. Объектами исследования служили выборки деревьев из смежных суходольного и болотного насаждений сосны обыкновенной, произрастающие в 17 квартале Старожильского участкового лесничества Пригородного лесничества. Таксационные показатели суходольного насаждения: состав 10С, возраст 80 лет, тип леса сосняк лишайниково-мшистый, полнота 0,75. Таксационные показатели болотного насаждения (болото Изи Куп): состав 10С, разновозрастное, тип леса сосняк сфагновый, полнота 0,62. На данном участке для анализа делали выборку деревьев одного возраста. В каждом насаждении отобрано случайным образом по 30 деревьев. Для выделения ДНК из камбиального слоя ствола использовали СТАВ-метод [22]. Характеристика использованных в работе микросателлитных праймеров приведена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика использованных микросателлитных праймеров

Локус	Мотив локуса	Сиквенс прямого (F) и обратного (R) праймера (5'-3')	Температура отжига, С°	Ссылка на источник
Lop1	(ta) ₁₀	F: ggctaattggccggccagtgct R: gcgattacaggggtgcagcct	58	Liewlaksaneeyanawin et al., 2004 [23]
Lop3	(ta) ₉	F: gtctccagccagttcacctgc R: cagtggatctgtcacctctc	58	Liewlaksaneeyanawin et al., 2004 [23]
PtTX2146	(gct) ₄ gcc(gct) ₇ gcc(gct) ₈	F: cctggggatttggattgggtatttg R: atattttccttggccctccagaca	61	Liewlaksaneeyanawin et al., 2004 [23]
PtTX3107	(cat) ₁₄	F: aaacaagcccacatcgtaatc R: tcccctggatctgagga	60	Liewlaksaneeyanawin et al., 2004 [23]
Psy117	(ta) ₇	F: tggctgcaaatcaatcgaa R: gggtaggaatgcaagttaggc	55	Sebastiani et al., 2012 [24]

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали смесь следующего состава: 1,5 мкл – буфер для ПЦР, 0,3 мкл – dNTPs, 0,3 мкл – Tag-полимераза, по 0,2 мкл прямого и обратного праймера, 11,5 мкл – стерильная вода для ПЦП, 1,0 мкл – геномная ДНК. Для ПЦР использовали коммерческий набор Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия) и термоциклер MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Длину микросателлитных аллелей определяли с помощью капиллярного электрофореза с использованием ABI PRISM Genetic Analyser 3100 и программы GeneMarker. Расчёт параметров генетической изменчивости выполняли в программе GenAIX6 [25].

Результаты исследования. Анализ пяти ядерных микросателлитных локусов позволил выявить всего 40 аллелей, из которых 32 обнаружены в суходольной и 36 в болотной ценопопуляции (табл. 2). Наибольшее число аллелей детектировано для локусов PtTX2146 и PtTX3107 (от восьми до десяти шт.). Для остальных локусов установлено меньше аллельное разнообразие, количество обнаруженных аллелей варьировало от четырёх до шести шт.

Сравнительный анализ частот встречаемости аллелей в сравниваемых выборках показал, что часть аллелей встречались в выборках деревьев из суходольных

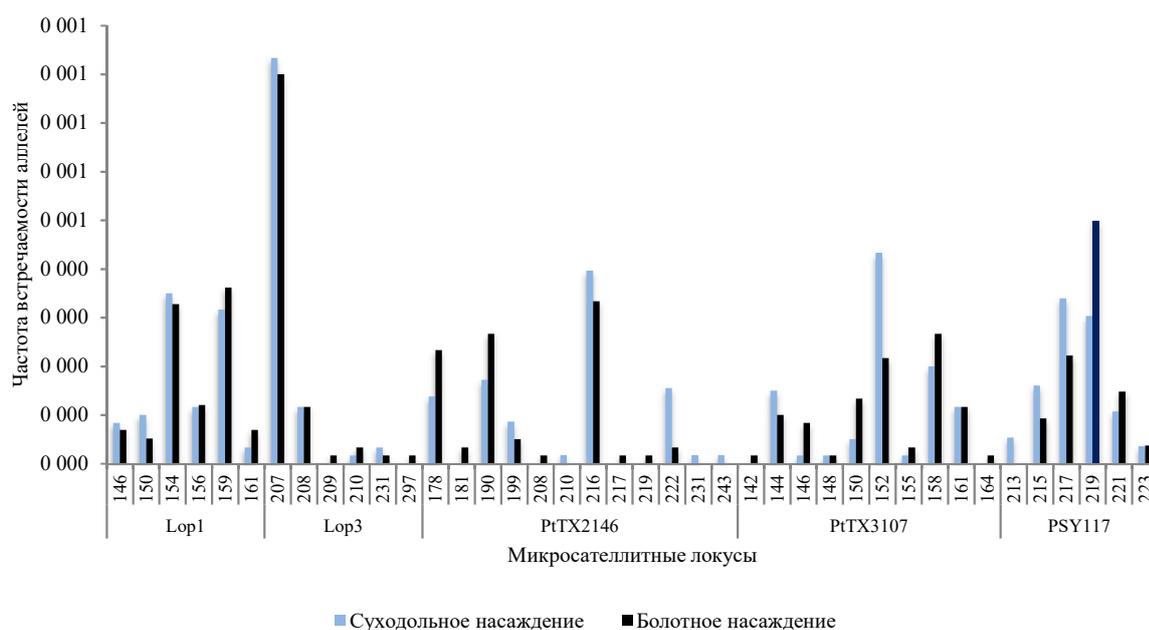
и болотных насаждений с близкой частотой, в то время как другие аллели существенно отличались по частоте встречаемости (см. рис. с. 73). Например, близкой частотой встречаемости характеризуются аллель длиной 156 п.н. в локусе Lop1, 208 п.н. в локусе Lop3, 161 п.н. в локусе PtTX3107 и др. Примерами существенно отличающихся по частоте встречаемости аллелей могут служить аллели длиной 178 и 222 п.н. в локусе PtTX2146 и аллели длиной 150 и 152 п.н. в локусе PtTX3107.

Значения критерия соответствия χ^2 указывают на отсутствие достоверных отличий в рядах распределения встречаемости аллелей всех микросателлитных локусов, так как во всех случаях расчётное значение критерия выше табличного (табл. 2). Однако на отличающуюся генетическую структуру сравниваемых ценопопуляций указывает наличие уникальных аллелей, которые были обнаружены только в одном экотопе и отсутствовали в другом. Так, у деревьев из суходольной ценопопуляции выявлено четыре уникальных аллеля, а у деревьев из суходольной ценопопуляции – 10. Ранее также были установлены различия в количестве аллелей аллозимных локусов для насаждений сосны обыкновенной и ели чёрной, произрастающих в разных почвенно-экологических условиях [13, 26].

Таблица 2

Аллельное разнообразие микросателлитных локусов и оценка достоверности различия частот встречаемости аллелей в смежных суходольной и болотной ценопопуляциях

Локус	Характеристика аллельного разнообразия				Критерий χ^2	
	Болото		Суходол		$\chi^2_{\text{расч.}}$	$\chi^2_{\text{табл.}}$ при P=0,01
	Количество аллелей (уникальных)	Длина аллелей	Количество аллелей (уникальных)	Длина аллелей		
Lop1	6 (0)	146–161	6 (0)	146–161	1,76	15,09
Lop3	6 (2)	207–287	4 (0)	207–231	2,72	15,09
PtTX2146	9 (4)	178–222	8 (3)	178–243	12,2	24,72
PtTX3107	10 (2)	142–164	8 (0)	144–161	12,76	21,66
Psy117	5 (0)	215–223	6 (1)	213–223	12,28	15,09
Итого	36 (8)		32 (4)			



Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов в смежных суходольном и болотном насаждениях сосны обыкновенной

Тест на соответствие равновесию Харди–Вайнберга на основе расчёта критерия χ^2 показал, что в суходольном насаждении наблюдаются достоверные различия между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью у локусов PtTX2106 и PtTX3107 при уровне значимости 0,001 и у локуса Psy117 при уровне значимости 0,05

(табл. 3). В болотном насаждении в неравновесном состоянии также находятся три локуса из пяти, при этом достоверные различия между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью установлены для локуса Lop1 при уровне значимости 0,05, локуса PtTX3107 при уровне значимости 0,01 и локуса Lop3 при уровне значимости 0,001.

Таблица 3

Результаты χ^2 теста соответствия равновесию Харди–Вайнберга

Локус	Количество степеней свободы, df	Критерий χ^2			Фактическое значение χ^2
		Критическое значение χ^2 при уровне значимости			
		0,05	0,01	0,001	
Суходол					
Lop1	15	25,0	30,6	37,7	21,091
Lop3	6	12,6	16,8	22,5	1,200
PtTX2146	28	41,3	48,3	56,9	70,069***
PtTX3107	28	41,3	48,3	56,9	96,731***
Psy117	15	25,0	30,6	37,7	28,309*
Болото «Изи Куп»					
Lop1	15	25,0	30,6	37,7	29,386*
Lop3	15	25,0	30,6	37,7	61,302***
PtTX2146	36	51,0	58,6	67,9	30,772
PtTX3107	45	61,7	70,0	80,0	76,560**
Psy117	10	18,3	23,2	29,6	17,063

Примечание: различия достоверны при * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

Смежные суходольная и болотная ценопопуляции сосны обыкновенной оказались близкими по уровню генетической изменчивости (табл. 4). Некоторые различия были установлены только для среднего числа аллелей на локус, которое составило 6,40 и 7,20 соответственно для выборки деревьев из суходольного и болотного насаждений. Остальные показатели генетического разнообразия были очень близкими ($N_e=3,46$ и $3,57$; $H_o=0,58$ и $0,59$; $H_e=0,66$ и $0,67$). Другими авторами, на основе анализа разных видов молекулярных маркеров для популяций древесных видов, также показано отсутствие связи между уровнем гетерозиготности и почвенно-экологическими условиями [13, 19, 26].

Для обоих выборок деревьев установлен небольшой дефицит гетерозигот ($F=0,09$ и $0,08$). Наибольший дефицит гетерозигот был выявлен для локусов *Lop1* ($F=0,19$) и *Psy117* ($F=0,33$) в суходольной ценопопуляции и локусов *PtTX3107* ($F=0,32$) и *Psy117* ($F=0,33$) в болотной ценопопуляции. Для двух локусов (*Lop3* и *PtTX2146*) в обоих насаждениях наблюдался незначительный избыток гетерозигот. В

целом, выявленный уровень гетерозиготности ($0,58$ и $0,59$) соответствует значениям наблюдаемой гетерозиготности ядерных микросателлитных локусов установленным ранее для сосны кедровой сибирской и сосны обыкновенной, которые находились в пределах $0,48-0,77$ [19, 27, 28].

Анализ структуры генетической изменчивости с помощью индексов фиксации Райта показал, что каждое дерево в выборке имеет $8,3\%$ дефицит гетерозигот относительно ценопопуляции ($F_{is}=0,083$) и $9,3\%$ дефицит гетерозигот относительно вида ($F_{it}=0,093$) (табл. 5). Наибольший вклад в дефицит гетерозигот особей относительно ценопопуляции и относительно вида имеют локусы *PtTX3107* и *Psy117*, дефицит которых составляет $20,4-22,8\%$. Степень подразделённости популяций, оцениваемая по индексу фиксации популяции относительно вида (F_{ST}), по разным локусам варьирует от $0,002$ до $0,021$ и в среднем составляет $0,012$. Таким образом, большая часть генетического разнообразия сосредоточена внутри ценопопуляций, а на долю межценопопуляционной изменчивости приходится только $1,2\%$.

Таблица 4

Параметры генетического разнообразия деревьев сосны обыкновенной из смежных суходольной и болотной ценопопуляций по SSR-маркерам

Локус	Количество аллелей на локус, N_a	Эффективное количество аллелей, N_e	Наблюдаемая гетерозиготность, H_o	Ожидаемая гетерозиготность, H_e	Коэффициент инбридинга, F
Суходольная ценопопуляция (ПЛ)					
<i>Lop1</i>	6	3,93	0,60	0,75	0,19
<i>Lop3</i>	4	1,41	0,33	0,29	- 0,15
<i>PtTX2146</i>	8	4,19	0,79	0,76	- 0,04
<i>PtTX3107</i>	8	3,74	0,67	0,73	0,09
<i>Psy117</i>	6	3,73	0,50	0,75	0,33
Среднее	$6,40 \pm 0,75$	$3,46 \pm 0,52$	$0,58 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,09$	$0,09 \pm 0,08$
Болотная ценопопуляция (Изи Куп)					
<i>Lop1</i>	6	3,77	0,69	0,73	0,06
<i>Lop3</i>	6	1,52	0,37	0,34	- 0,06
<i>PtTX2146</i>	9	4,13	0,77	0,76	- 0,01
<i>PtTX3107</i>	10	5,94	0,57	0,83	0,32
<i>Psy117</i>	5	3,02	0,63	0,67	0,33
Среднее	$7,20 \pm 0,97$	$3,68 \pm 0,72$	$0,60 \pm 0,07$	$0,67 \pm 0,09$	$0,07 \pm 0,06$

Таблица 5

Индексы фиксации Райта (Fis, Fit и Fst) для пяти микросателлитных локусов

Локус	Индекс фиксации особи относительно популяции, Fis	Индекс фиксации особи относительно вида, Fit	Индекс фиксации популяции относительно вида, Fst
Lop1	0,129	0,131	0,002
Lop3	-0,102	-0,100	0,002
PtTX2146	-0,027	-0,013	0,013
PtTX3107	0,212	0,228	0,021
Psy117	0,204	0,221	0,021
Для всех локусов	0,083±0,063	0,093±0,065	0,012±0,004

По данным других авторов, при исследовании популяционной структуры хвойных видов с помощью SSR-маркеров индекс фиксации популяции относительно вида варьировал от 0,017 до 0,033 [19, 27, 28]. Таким образом, для хвойных вполне характерно, что подавляющая часть генетического разнообразия скрыта внутри популяций.

Выводы

1. Смежные болотная и суходольная ценопопуляции отличаются аллельным разнообразием изученных микросателлитных локусов. Достоверных различий в рядах распределения встречаемости аллелей у сравниваемых ценопопуляций не выявлено. Однако на отличающуюся генетическую структуру смежных болотной и суходольной ценопопуляций указывает

наличие уникальных аллелей, которые были обнаружены только в одном экотопе и отсутствовали в другом. В каждой из ценопопуляций для большинства микросателлитных локусов установлены достоверные различия между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью.

2. Для сравниваемых ценопопуляций установлены близкие значения показателей генетической изменчивости. Некоторые различия были установлены только для среднего числа аллелей. В целом для обеих ценопопуляций установлен незначительный дефицит гетерозигот.

3. Результаты F_{ST} -статистики Райта показали, что большая часть генетического разнообразия сосредоточена внутри ценопопуляций, а на долю межценопопуляционной изменчивости приходится только 1,2 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00483) и Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения базовой части государственного задания высшим учебным заведениям и научным организациям в сфере научной деятельности (г/б НИР 37.8531.2017).

Список литературы

1. Mosca E., Eckert A.J., Di Pierro E.A. et al. The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps / E. Mosca, A.J. Eckert, E.A. Di Pierro et al. // *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 2. No 22. P. 5530–5545.
2. 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 / A.I. Vidyakin, S.V. Boronnikova, Yu. S. Nechayeva et al. // *Russian Journal of Genetics*. 2015. Vol. 51. No 12. Pp. 1213–1220.
3. Bower A.D., Aitken S.N. Ecological genetics and seed transfer guidelines for *Pinus albicaulis* (Pinaceae) // *American Journal of Botany*. 2008. Vol. 95. No 1. P. 66–76.
4. Neutral and adaptive drivers of microgeographic genetic divergence within continuous populations: the case of the neotropical tree *Eperua falcata* (Aubl.) / L. Brousseau, M. Foll, C. Scotti-Saintagne et al. // *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10. No 3. e0121394. available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127134>
5. Local adaptation at fine spatial scales: an example from sugar pine (*Pinus lambertiana*, Pinaceae) / A.J. Eckert, P.E. Maloney, D.R. Vogler et al. // *Tree Genetics & Genomes*. 2015. No 11. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0863-0>

6. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Ефремов С.П. Морфология пыльцы сосны обыкновенной на болотах и суходолах // Лесоведение. 2004. № 6. С. 58–75.
7. Особенности генеративной сферы сосны обыкновенной болотных и суходольных популяций / Т.С. Седельникова, А.В. Пименов, С.П. Ефремов и др. // Лесоведение. 2007. № 4. С. 44–50.
8. Пименов А.В., Седельникова Т.С. Качественная оценка формового разнообразия сосны обыкновенной в лесоболотных комплексах Западной Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30. № 1–2. С. 157–161.
9. Видякин А.И. Фенетика, популяционная структура и сохранение генетического фонда сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Хвойные бореальной зоны. 2007. Т. 24. № 2–3. С. 159–166.
10. Муратова Е.Н., Седельникова Т.С. Кариологическое исследование болотных и суходольных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Экология. 1993. № 6. С. 41–50.
11. Седельникова Т.С., Муратова Е.Н., Пименов А.В. Экологическая обусловленность дифференциации кариотипов болотных и суходольных популяций видов *Pinaceae* // Ботанический журнал. 2010. Т. 95. № 11. С. 1543–1520.
12. Дворник В.Я., Котов В.С., Михеенко И.П. Генетическая дифференциация соседних популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в различных экотопах // Генетика. 1998. № 9. С. 1258–1262.
13. Ларионова А.Я., Экарт Э.К. Генетическое разнообразие и дифференциация болотных и суходольных популяций сосны // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. XXVII. № 1–2. С. 120–126.
14. Генетическая дифференциация болотных и суходольных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на Русской равнине / И.В. Петрова, С.Н. Санников, О.Е. Черепанова и др. // Лесной журнал. 2013. № 6. С. 29–37.
15. Генетическая изменчивость и дифференциация суходольной и болотной ценопопуляций сосны обыкновенной в Республике Марий Эл / О.В. Шейкина, Ю.П. Демаков, Ю.Ф. Гладков и др. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). 2013. № 94 (10). URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/54.pdf>
16. Reproductive isolation and disruptive selection as factors of genetic divergence between *Pinus sylvestris* L. populations / I.V. Petrova, S.N. Sannikov, O.E. Cherepanova et al. // Russian Journal of Ecology. 2013. No 4. P. 296–302.
17. Петрова И.В., Санников С.Н., Черепанова О.Е. Репродуктивная изоляция и генетическая дифференциация суходольных и болотных популяций *Pinus sylvestris* L. Западной Сибири и Русской равнины // Сибирский лесной журнал. 2017. № 4. С. 28–37.
18. Махатков И.Д., Тараканов В.В., Тюпина В.М. Фенетическая структура популяций сосны на суходолах и болотах Западной Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2007. № 2–3. С. 248–250.
19. Analysis of genetic structure and differentiation of the bog and dry land populations of *Pinus sibirica* Du Tour based on nuclear microsatellite loci / N.V. Oreshkova, T.S. Sedel'nikova, A.V. Pimenov et al. // Russian Journal of Genetics. 2014. Vol. 50. No 9. Pp. 934–941.
20. Захарова К.В., Сейц К.С. Роль экологических факторов в формировании генетической структуры популяций *P. abies* (L.) Karst. // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 2. С. 11–20.
21. Калько Г.В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2015. № 4. С. 19–34.
22. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. № 19. P. 11–15.
23. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs / Ch. Liewlaksaneeyanawin, C.E. Ritland, Y.A. El-Kassaby et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2004. No 109. Pp. 361–369.
24. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* / F. Sebastiani, F. Pinzauti, S.T. Kujala et al. // Conservation Genetics Resources. 2012. No 4. Pp. 231–234.
25. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. No 6. P. 288–295.
26. O'reilly G.J., Parker W.H., Cheliak W.M. Isozyme differentiation of upland and lowland *Picea mariana* stands in northern Ontario // Silvae Genetica. 1985. No 34. P. 214–220.
27. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy / P. Belletti, D. Ferrazzini, A. Piotti et al. // European Journal of Forest Research. 2012. No 131. P. 1127–1138.
28. Bilgen B.B., Kaya N. Genetic diversity among *Pinus sylvestris* L. populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers // Fresenius Environmental Bulletin. 2017. Vol. 26. No 11. P. 6873–6881.

Статья поступила в редакцию 30.10.19.

Принята к публикации 15.11.19.

Информация об авторах

ГЛАДКОВ Юрий Федорович – начальник отдела защиты леса и государственного лесопатологического мониторинга, Филиал ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл». Область научных интересов – использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве и селекции сосны обыкновенной. Автор 16 публикаций.

ШЕЙКИНА Ольга Викторовна – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесных культур, селекции, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – популяционная и экологическая генетика древесных видов, использование ДНК-технологий в лесном семеноводстве и селекции древесных видов. Автор 76 публикаций.

UDC 630.1 (575.22)

DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70

GENETIC POLYMORPHISM OF THE PINUS SYLVESTRIS TREES FROM BOG LAND AND UPLAND CENOPOPULATIONS ON NUCLEAR SSR LOCI

Yu. F. Gladkov¹, O. V. Sheikina²

¹ Branch of FBI “Russian Office of Forest Protection” – “Office of Forest Protection in the Republic of Mari El”,

83, Komsomolskaya St., Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation

² Volga State University of Technology,

3, Lenin Sq., Yoshkar-Ola, 424000, Russian federation

E-mail: ShejkinaOV@volgatech.net

Keywords: Scots pine (*Pinus sylvestris* L.); bog land and upland cenopopulations; genetic polymorphism; nuclear microsatellites.

ABSTRACT

Introduction. The analysis of environmental barriers influence on the genetic structure and the diversity of forest species is one of the vital tasks for population biology. **The goal** of the research is to make a comparative assessment of genetic polymorphism and to reveal the peculiarities of genetic structure of bog land and upland cenopopulations on the basis of the analysis of variability of microsatellite regions of nuclear DNA. **Objects and research methodology.** The mixed bog land and upland cenopopulations of Scots pine were taken for the research. Thirty trees of each cenopopulation were studied. Five nuclear SSR loci were used for the analysis. Calculation of the parameters of genetic variability was made using GenA1EX6. **Research results.** Number of discovered alleles varied from 3 to 10 for different microsatellite loci. In total, 36 alleles in the bog land cenopopulation and 32 alleles in the upland cenopopulation were revealed. There were 8 and 4 unique alleles, respectively. However, χ^2 -test demonstrated no significant difference in the allele frequency in bog land and upland cenopopulations. The assessment of conformity to Hardy-Weinberg equilibrium showed that for microsatellite loci PtTX2106, PtTX3107, and Psl117 in the upland cenopopulation and for loci Lop1, PtTX3107, and Lop3 in the bog land cenopopulation the significant differences between the observed and expected heterozygosity had been revealed. The studied cenopopulations are described by the nearly level of genetic variation. The indices of genetic variability were: number of alleles in a locus 6.40 and 7.20; effective number of alleles 3.46 and 3.68; observed heterozygosity 0.58 and 0.60; expected heterozygosity 0.66 and 0.67, Wright's fixation index 0.09 and 0.07. The differentiation of cenopopulation of Scots pine in SSR markers was 1.2% ($F_{ST}=0.012$). **Conclusion.** The studied bog land and upland cenopopulations are described by the nearly level of genetic variation and have no specific peculiarities in the allele frequency. But the presence of unique alleles found in one ecotope is the evidence of different genetic structure of contiguous bog land and upland cenopopulations.

The paper was prepared with the financial support of Russian Foundation of Fundamental Research (project 13-04-00483) and Ministry of Education and Science of the Russian Federation as accomplishment of a base part of state task for higher educational institutions and scientific organizations in the field of research activity (R&D 37.8531.2017).

REFERENCES

1. Mosca E., Eckert A.J., Di Piero E.A. et al. The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps. *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 2. No 22. P. 5530–5545.
2. Vidyakin A.I., Boronnikova S.V., Nechayeva Yu.S. et al. 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. *Russian Journal of Genetics*. 2015. Vol. 51. No 12. P. 1213–1220.
3. Bower A.D., Aitken S.N. Ecological genetics and seed transfer guidelines for *Pinus albicaulis* (Pinaceae). *American Journal of Botany*. 2008. Vol. 95. No 1. P. 66–76.
4. Brousseau L., Foll M., Scotti-Saintagne C. et al. Neutral and adaptive drivers of microgeographic genetic divergence within continuous populations: the case of the neotropical tree *Eperua falcata* (Aubl.). *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10. No 3. e0121394. available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127134>
5. Eckert A.J., Maloney P.E., Vogler D.R. et al. Local adaptation at fine spatial scales: an example from sugar pine (*Pinus lambertiana*, Pinaceae). *Tree Genetics & Genomes*. 2015. No 11. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0863-0>.
6. Sedelnikova T.S., Pimenov A.V., Efremov S.P. Morfologiya pyltsov sosny obyknovnoy na bolotakh i sukhodolakh [Morphology of pollen in scots pine trees growing in bogs and dry valleys.]. *Lesovedenie* [Silviculture]. 2004. No. 6. Pp. 58–75. (In Russ.).
7. Sedelnikova T.S., Pimenov A.V., Efremov S.P. et al. Osobennosti generativnoy sfery sosny obyknovnoy bolotnykh i sukhodolnykh populyatsiy [Specific features of the generative sphere in scots pine of bog and dry valley populations.]. *Lesovedenie* [Silviculture]. 2007. No. 4, Pp. 44–50. (In Russ.).
8. Pimenov A.V., Sedelnikova T.S. Kachestvennaya otsenka formovogo raznoobraziya sosny obyknovnoy v lesobolotnykh kompleksakh Zapadnoy Sibiri [Qualitative assessment of the form diversity of Scots pine in the forest-swamp complexes of Western Siberia.]. *Khvoynye borealnoy zony* [The coniferous species of the boreal zone]. 2012. Vol. 30. No. 1–2, Pp. 157–161. (In Russ.).
9. Vidyakin A.I. Fenetika, populyatsionnaya struktura i sokhranenie geneticheskogo fonda sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris* L.) [Phenetics, population structure and conservation of the genetic fund of Scots pine.]. *Khvoynye borealnoy zony* [The coniferous species of the boreal zone]. 2007. Vol. 24, No. 2–3, Pp. 159–166. (In Russ.).
10. Muratova E.N., Sedelnikova T.S. Kariologicheskoe issledovanie bolotnykh i sukhodolnykh populyatsiy sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris* L.) [Karyological study of bog land and upland populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)]. *Ekologiya* [Ecology]. 1993. No. 6. Pp. 41–50. (In Russ.).
11. Sedelnikova T.S., Muratova E.N., Pimenov A.V. Ekologicheskaya obuslovlennost differentsiatsii kariotipov bolotnykh i sukhodolnykh populyatsiy vidov Pinaceae [Ecological determination of karyotypes differentiation in bog and dry valley populations of Pinaceae species.]. *Botanicheskiy zhurnal* [Botanical Journal]. 2010. Vol. 95, No. 11. Pp. 1543–1520. (In Russ.).
12. Dvornik V.Ya., Kotov V.S., Mikheenko I.P. Geneticheskaya differentsiatsiya sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris* L.), proizrastayushchikh v razlichnykh ekotopakh [Genetic differentiation of neighboring populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growing in various ecotopes.]. *Genetika* [Genetics]. 1998. No. 9. Pp. 1258–1262. (In Russ.).
13. Larionova A.Ya., Ekart E.K. Geneticheskoe raznoobrazie i differentsiatsiya bolotnykh i sukhodolnykh populyatsiy sosny [Genetic diversity and differentiation of bog land and upland pine populations.]. *Khvoynye borealnoy zony* [The coniferous species of the boreal zone]. 2010. Vol. XXVII, No. 1–2, Pp. 120–126. (In Russ.).
14. Petrova I.V., Sannikov S.N., Cherepanova O.E. et al. Geneticheskaya differentsiatsiya bolotnykh i sukhodolnykh populyatsiy sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris* L.) na Russkoy ravnine [Genetic differentiation of bog land and upland populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) on the Russian Plain.]. *Lesnoy zhurnal* [Forestry Magazine]. 2013. No. 6. Pp. 29–37. (In Russ.).
15. Sheikina O.V., Demakov Yu.P., Gladkov Yu.F. et al. Geneticheskaya izmenchivost i differentsiatsiya sukhodolnoy i bolotnoy tsenopopulyatsiy sosny obyknovnoy v Respublike Marii El [Genetic variation and differentiation of *Pinus Sylvestris* in the swamp and dry land cenopopulations of Mariy El Republic.]. *Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyi zhurnal KubGAU)* [Polythematic Network E-scientific Journal of Kuban State Agrarian University (Scientific Journal of KubSAU)]. 2013. No. 94(10). URL: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/54.pdf> (In Russ.).
16. Petrova I.V., Sannikov S.N., Cherepanova O.E. et al. Reproductive isolation and disruptive selection as factors of genetic divergence between *Pinus sylvestris* L. populations. *Russian Journal of Ecology*. 2013. No 4. P. 296–302.
17. Petrova I.V., Sannikov S.N., Cherepanova O.E. Reproduktivnaya izolyatsiya i geneticheskaya differentsiatsiya sukhodolnykh i bolotnykh populyatsiy *Pinus sylvestris* L. Zapadnoy Sibiri i Russkoy Ravniny [Reproductive isolation and genetic differen-

tiation of dry land and bog populations of *Pinus sylvestris* L. in Western Siberia and Russian plain]. *Sibirskiy lesnoy zhurnal* [Siberian Journal of Forest Science]. 2017. No. 4. Pp. 28–37. (In Russ.).

18. Makhatkov I.D., Tarakanov V.V., Tupina V.M. Feneticheskaya struktura populyatsiy sosny na sukhodolakh i bolotakh Zapadnoy Sibiri [Phenetic structure of pine populations in dry lands and swamps of Western Siberia]. *Khvoynye borealnoy zony* [The coniferous species of the boreal zone]. 2007. No. 2–3. Pp. 248–250. (In Russ.).

19. Oreshkova N.V., Sedel'nikova T.S., Pimenov A.V. et al. Analysis of genetic structure and differentiation of the bog and dry land populations of *Pinus sibirica* Du Tour based on nuclear microsatellite loci. *Russian Journal of Genetics*. 2014. Vol. 50. No 9. P. 934–941.

20. Zakharova K.V., Seits K.S. Rol ekologicheskikh faktorov v formirovaniy geneticheskoy struktury populyatsiy *P. abies* (L.) Karst. [The role of environmental factors in the formation of the genetic structure of *P. abies* populations]. *Ekologicheskaya genetika* [Ecological Genetics]. 2017. Vol. 15. No. 2. Pp. 11–20. (In Russ.).

21. Kalko G.V. DNK-markery dlya otsenki geneticheskikh resursov eli i sosny [DNA markers for assessing the genetic resources of spruce and pine.]. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaistva* [Transactions of Saint-Petersburg Forestry Research Institute]. 2015. No. 4. Pp. 19–34. (In Russ.).

22. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987. No 19. P. 11–15.

23. Liewlaksaneeyanawin Ch., Ritland C.E., El-Kassaby Y.A. et al. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004. No 109. P. 361–369.

24. Sebastiani F., Pinzauti F., Kujala S.T. et al. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris*. *Conservation Genetics Resources*. 2012. No 4. 231–234.

25. Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006. No 6. P. 288–295.

26. O'reilly G.J., Parker W.H., Cheliak W.M. Isozyme differentiation of upland and lowland *Picea mariana* stands in northern Ontario. *Silvae Genetica*. 1985. No 34. P. 214–220.

27. Belletti P., Ferrazzini D., Piotti A. et al. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *European Journal of Forest Research*. 2012. No 131. P. 1127–1138.

28. Bilgen B.B., Kaya N. Genetic diversity among *Pinus sylvestris* L. populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2017. Vol. 26. No 11. P. 6873–6881.

The article was received 30.10.19.
Accepted for publication 15.11.19.

For citation: Gladkov Yu. F., Sheikina O. V. Genetic Polymorphism of the *Pinus Sylvestris* Trees from Bog Land and Upland Cenopopulations on Nuclear SSR Loci. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management*. 2019. No 4 (44). Pp. 70–79. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70

Information about the authors

Yuriy F. Gladkov – Head of the Department of Forest Protection and State Forest Health Monitoring, Branch of FBI “Russian Office of Forest Protection” – “Office of Forest Protection in the Republic of Mari El”. Research interests – use of DNA technologies in forest seedage and Scots pine selection. The author of 16 publications.

Olga V. Sheikina – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Chair of Forest Plantations, Selection, and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – population and ecological genetics of woody species, use of DNA technologies in forest seedage and woody species selection. The author of 76 publications.