

Генетическое разнообразие популяций сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L.

© 2019. М. В. Рябухина¹, к. б. н., с. н. с., Р. Г. Калякина², к. б. н., доцент, З. Н. Рябинина¹, д. б. н., профессор, Р. А. Майский³, к. т. н., доцент,
¹Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН, 460000, Россия, г. Оренбург, ул. 9 января, д. 29,
²Оренбургский государственный аграрный университет, 460000, Россия, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, д. 18,
³Уфимский государственный нефтяной технический университет, 450062, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Космонавтов, д. 1,
 e-mail: marija-rjabuhina@mail.ru, kalyakina_railya@mail.ru

В данной статье приводятся результаты оценки генетического разнообразия, генетической структуры и дифференциации популяций сосны обыкновенной в условиях Оренбургского Зауралья с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК (маркеры 14 изоферментных локусов из ферментных систем аспарататаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы, лейцинаминопептидазы, малатдегидрогеназы, формиатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы).

В изучаемых популяциях сосны обыкновенной по исследованным молекулярно-генетическим маркерам выявлен 51 аллель, большая часть из которых была общей. Частота встречаемости этих аллелей варьировала значительно и повсеместно: 62,7% аллельных вариантов были редкими или относительно редкими (частота встречаемости менее 5%). На показатель генетического разнообразия сосны обыкновенной оказывают влияние природно-климатические условия и географическая обособленность, следствием чего явилось большее генетическое разнообразие в популяции Карагайского бора.

Изучение подразделённости генетического разнообразия сосны обыкновенной показало высокий уровень популяционного генетического разнообразия и низкую степень дивергенции в изучаемых популяциях: 5,1% приходилось на межпопуляционную составляющую. Определение генетического расстояния Нея показало близкородственность популяций. Данный показатель составил 0,024. Анализ аллельного разнообразия свидетельствует о высокой стабильности и надёжности популяционных систем сосны обыкновенной и её эволюционной перспективности.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, генетическое разнообразие, межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК.

Genetic diversity of *Pinus sylvestris* L. pine populations

© 2019. M. V. Ryabukhina¹ ORCID: 0000-0002-8409-6630*,
 R. G. Kalyakina² ORCID: 0000-0001-8892-0669*, Z. N. Ryabinina¹ ORCID: 0000-0002-4995-0606*,
 R. A. Maiski ORCID: 0000-0001-9000-8919*
¹Federal Scientific Center for Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, 29, 9 Yanvary St., Orenburg, Russia, 460000,
²Orenburg State Agrarian University, 18, Chelyuskintsev St., Orenburg, Russia, 460000,
³Ufa State Petroleum Technological University, 1, Kosmonavtov, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia, 450062,
 e-mail: marija-rjabuhina@mail.ru, kalyakina_railya@mail.ru

This article presents the results of the assessment of genetic diversity, genetic structure and differentiation of Scots pine in the conditions of Orenburg Zauralye using intermicrosatellite analysis of DNA polymorphism (markers of 14 isoenzyme loci from the enzyme systems aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase, leucine neuropathy, and others).

In the studied populations of Scots pine, 51 alleles were detected by the studied molecular genetic markers, most of which were common. The frequency of occurrence of these alleles varied significantly everywhere: 62.7% of allelic

variants are rare or relatively rare (frequency of occurrence is less than 5%). The indicator of the genetic diversity of Scots pine is influenced by the natural and climatic conditions and geographical isolation, resulting in a greater genetic diversity in the population of Karagai forest.

The study of the division of the genetic diversity of Scots pine showed a high level of population genetic diversity and a low degree of divergence in the studied populations: 5.1% accounted for the interpopulation component. Determination of the genetic distance of Nei showed that the populations are closely related. This figure was 0.024. Analysis of allelic diversity indicates a high stability and reliability of the population of Scots pine and its evolutionary perspective.

Keywords: scots pine, genetic diversity, intermicrosatellite DNA polymorphism analysis.

Генетическое разнообразие и внутривидовая дифференциация имеют важное биосферное и ресурсное значение. Знание генетической структуры популяций, уровня их генетической изменчивости, а также характера её распределения в пределах ареала вида позволяет оценить его генетический потенциал. Разработка и обоснование комплекса мероприятий, направленных на максимальное сохранение генетического разнообразия вида в процессе долгосрочного неистощительного природопользования и воспроизводства должна основываться на данных о его генетической структуре [1–4].

При изучении популяций генетическое разнообразие оценивается с использованием различных типов ДНК-маркёров: маркёры, соответствующие гену, аллели которого имеют чётко выраженные отличия на уровне фенотипа; молекулярные маркёры, соответствующие гену или некодирующему участку генома, разные варианты которого отличаются на уровне ДНК; изоферменты [5–7]. Первый тип маркёров косвенно отражают состояние генетических ресурсов, так как основан на изучении наследуемых морфологических признаков. Классическим методом исследования генофонда популяции является изучение генетических процессов с помощью белковых маркёров (изоферментов). В настоящее время широко распространены исследования молекулярных ДНК-маркёров, соответствующих гену или некодирующему участку генома методами блотгибридизации, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ДНК-чипов. При изучении генома голосеменных растений проводится выявление полиморфных и стабильно воспроизводящихся при повторных ПЦР ДНК-маркёров, а также молекулярных маркёров, основанных на микросателлитах, в частности метод межмикросателлитного анализа (ISSR-Inter Simple Sequence Repeats). При этом используется ПЦР с несколькими праймерами, которые состоят из tandemных коротких 2–4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера.

В современной литературе можно встретить данные о генетическом разнообразии разных видов хвойных: сосны обыкновенной [8–10], сосны ладанной [11, 12], сосны Ламберта [13], ели обыкновенной [7], видов рода лиственница [14–16]. Однако исследования носят отрывочный характер. Достоверно установлена географическая изменчивость популяций хвойных, в том числе и сосны обыкновенной, которая распространена на большей части нашей страны. Приспособленность данного вида к большому разнообразию природно-климатических условий обусловлена генетической пластичностью вида.

В условиях степной зоны с низкой лесистостью на территории Оренбуржья лесопокрываемые участки распространены неравномерно, большая часть расположена в Оренбургском Предуралье. С приграничных территорий степей и полупустынь Казахстана через Оренбургское Зауралье шло опустынивание территорий. Однако и на территории Зауралья ещё сохранились островки реликтового леса, которые в доисторические времена были достаточно обширны. Часть этих лесов представлена сосной обыкновенной, которая показала свою перспективность и может являться лесобразующей породой в условиях Оренбуржья. Приоритетность задач лесовосстановления и лесоразведения устойчивых коренных лесобразующих видов в Зауралье обуславливает необходимость изучения генетической структуры перспективных лесобразующих пород.

Целью работы явилась оценка генетического разнообразия, генетической структуры и дифференциации популяций сосны обыкновенной в условиях Оренбургского Зауралья с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК.

Объекты и методы

Объектами исследований являлись две реликтовые популяции сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), занимающие пограничное положение с культурными насаждениями на

территории Оренбургского Зауралья: Карагайский и Адрианопольский боры. Обе популяции находятся на границе ареала сосны обыкновенной. Однако, природно-климатические условия местопроизрастания отличны. Карагайский бор – скалисто-лесное урочище в ущельеобразной долине реки Губерли. Адрианопольский бор расположен на гранитных массивах древней донеогеновой террасы. Климат на территории Карагай-Покровского бора мягче, зимы более тёплые и снежные: среднемесячная температура января выше на 1,5 °С, высота снежного покрова также выше на 20 см, глубина промерзания почвы на 40 см меньше [17]. В связи с этим, популяции находятся в разных физико-географических и ботанических зонах. Карагай-Покровский бор относится к Южно-Уральской низкогорной лесостепной провинции, богато разнотравным-злаковым степям, Адрианопольский бор – к лесостепной провинции Зауральского плато, разнотравно-ковыльным степям [18].

В обеих популяциях состояние древостоя оценивается как климаксовое, но в то же время отмечаются значительные площади подроста под пологом реликтового древостоя, что представляет значительный интерес в молекулярно-генетических исследованиях естественного самовозобновления популяций *Pinus sylvestris* L.

Для исследования генетической структуры видов **ISSR-метод является наиболее популярным**, в связи с тем, что он сравнительно быстрый, дешёвый и обладает высокой точностью и улучшенной воспроизводимостью, по сравнению с другими методами [20–22, 24]. Данный метод основывается на выявлении молекулярно-генетических маркёров методом электрофоретического разделения ферментов из экстрактов тканей эндоспермов в вертикальных пластинах полиакриламидного геля с последующим гистохимическим окрашиванием [2, 3].

В настоящих исследованиях маркёрами служили 14 изоферментных локусов из ферментных систем аспартата миотрансферазы, глутамат дегидрогеназы, лейцина минопептидазы, малат-дегидрогеназы, формиат дегидрогеназы, супероксиддисмутазы. Изучая изоферментные электрофоретические спектры на основе идентификации аллельного состава, вычисляли частоту встречаемости аллелей, среднее число аллелей на локус (A), долю полиморфных локусов (P), наблюдаемую (Ho) и ожидаемую (He) гетерозиготность, коэффициент инбридинга (F). На основе F-статистик

Райта и G-статистик Нея определяли степень внутривидовой генетической подразделённости вида. Для количественной оценки генетической дифференциации популяций вычисляли генетическое расстояние Нея (D).

Результаты и обсуждение

В изучаемых популяциях сосны обыкновенной по исследованным молекулярно-генетическим маркерам был выявлен 51 аллель. Большая часть локусов была общей для обеих популяций, а частота их встречаемости варьировала значительно (от 5,0 до 97,1%). 62,7% аллельных вариантов являлись редкими или относительно редкими (частота встречаемости менее 5%). Редкие аллели встречались в обеих популяциях, так как данный признак не является географически приуроченным. Показатели уровня внутривидового генетического разнообразия сосны обыкновенной в популяции Карагайского бора составили: $A = 1,86$; $P = 54,81$; $H = 0,158$; $H_o = 0,133$, Адрианопольского бора – $A = 1,84$; $P = 54,67$; $H = 0,161$; $H_o = 0,131$, что соответствует данным работ [8–10] об изменчивости сосны обыкновенной. Межпопуляционные различия уровня генетического разнообразия в целом были незначительными, что также свидетельствует о высокой стабильности и надёжности популяционных систем сосны обыкновенной и её эволюционной перспективности (табл.).

В Карагайском бору параметры генетического разнообразия популяции были выше по сравнению с популяцией Адрианопольского бора, что подтверждает гипотезу З. Х. Шигапова с соавторами о том, что большая гетерозиготность обеспечивает популяции сосны обыкновенной выживаемость в жёстких природно-климатических условиях [23, 24].

Изучение подразделённости генетического разнообразия сосны обыкновенной показало высокий уровень популяционного генетического разнообразия и низкую степень дивергенции в изучаемых популяциях: 5,1% приходилось на межпопуляционную составляющую. Определение генетического расстояния Нея (D) показало близкородственность популяций. Данный показатель составил 0,024.

Доля полиморфных локусов является количественным показателем генетического разнообразия популяции, расчёт индекса Шеннона позволил выявить наибольшее ге-

Таблица / Table

Генетическая изменчивость сосны обыкновенной (в среднем в популяции)
Genetic variability of Scots pine (on average in the population)

Популяция Population	Число деревьев Number of trees	Среднее число аллелей на локус Average number of alleles per locus	Доля по- лиморфных локусов The proportion of polymorphic loci	Гетерозиготность Heterozygosity		Коэффи- циент инбри- динга Inbreeding coefficient	Индекс Шеннона Shannon Index
				наблюдаемая observable	ожидаемая expected		
Карагайский бор Karagai boron	181	1,860± 0,026*	54,810± 0,017*	0,133*	0,158*	0,164*	0,300± 0,025
Адриано- польский бор Andrianopol boron	167	1,840± 0,024*	54,570± 0,035*	0,131*	0,161*	0,196*	0,170± 0,022

Примечание: * $p < 0,05$ / Note: * $p < 0,05$.

нетическое разнообразие в популяции сосны обыкновенной в Карагай-Покровском бору (0,300±0,025) по сравнению с Адрианопольским бором (0,170±0,022).

Причиной этого является обособленность популяции сосен Карагай-Покровского бора и значительная географическая их удалённость от других массивов (более 250 км), а также антропогенная изоляция территории, уникальные ландшафтно-геоморфологические условия произрастания. Карагай-Покровский бор является реликтом ледникового периода, когда массивы сосново-берёзовых и сосново-лиственных лесов были широко распространены среди степей [18].

Заключение

Таким образом, анализ аллельного разнообразия свидетельствует о высокой стабильности и надёжности популяционных систем сосны обыкновенной и её эволюционной перспективности. Изучаемые популяции являются близкими в генетическом отношении. Однако высокое генетическое разнообразие внутри популяций свидетельствует об их устойчивости и значительном адаптационном потенциале. В связи с этим целесообразно рекомендовать Министерству природных ресурсов, экологии и имущественных отношений, Министерству лесного и охотничьего хозяйства Оренбургской области в качестве лесных генетических резерватов территории, на которых расположены реликтовые популяции *Pinus sylvestris* L.

Литература

1. Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 40–59.
2. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2013. 223 с.
3. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 619 с.
4. Крутовский К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве // Сибирский лесной журнал. 2014. № 4. С. 11–15.
5. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. Гомель: БелНИИЛХ, 1989. 164 с.
6. Brookes A.J. The essence of SNP // Gene. 1999. V. 234. P. 177–186.
7. Heinze B., KozielMonte A., Jahn D. Analysis of variation in chloroplast DNA sequences // Methods in molecular biology: Methods and Protocols. 2014. V. 1115. P. 85–120.
8. Pyhäjärvi T., García-Gil M.R., Knürr T., Mikkonen M., Wachowiak W., Savolainen O. Demographic history has influenced nucleotide diversity in European *Pinus sylvestris* populations // Genetics. 2007. V. 177. P. 1713–1724.
9. Wachowiak W., Balk P.A., Savolainen O. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // Tree Genetics & Genomes. 2009. V. 5. No. 1. P. 117–132.

10. 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. Т. 51. № 12. С. 1401–1409.

11. Gonzalez-Martinez S.C., Wheeler N.C., Ersoz E. Association genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood property traits // Genetics. 2007. V. 175. P. 399–409.

12. Chhatre V.E., Byram T.D., Neale D.B., Wegrzyn J.L., Krutovsky K.V. Genetic structure and association mapping of adaptive and selective traits in the East Texas loblolly pine (*Pinus taeda* L.) breeding populations // Tree Genetics & Genomes. 2013. V. 9. No. 5. P. 1161–1178.

13. Vangestel C., Vázquez-Lobo A., Martínez-García P.J., Calic I., Wegrzyn J.L., Neale D.B. Patterns of neutral and adaptive genetic diversity across the natural range of sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) // Tree Genetics & Genomes. 2016. V. 12. P. 51.

14. Heuertz M., De Paoli E., Källman T., Larsson H., Jurman I., Morgante M., Lascoux M., Gyllenstrand N. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst) // Genetics. 2006. V. 174. P. 2095–2105.

15. Wei X.-X., Wang X.-Q. Recolonization and radiation in *Larix* (Pinaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA paralogues // Mol. Ecology. 2004. No. 13. P. 3115–3123.

16. Khatib I.A., Ishiyama H., Inomata N., Wang X.-R., Szmidi A.E. Phylogeography of Eurasian *Larix* species inferred from nucleotide variation in two nuclear genes // Genes Genet. Syst. 2008. No. 83. P. 55–56.

17. Чибилёв А.А. Физико-географическое районирование Южного Урала как основа для формирования экологического каркаса региона // Степи Северной Евразии: Материалы седьмого международного симпозиума. Оренбург, 2015. С. 916–919.

18. Рябинина З.Н. Конспект флоры Оренбургской области. Екатеринбург: Ин-т степи УрО РАН, 1998. 163 с.

19. Farjon A. Conifers. London: Royal Botanic Gardens Kew, 2001. 309 p.

20. Ganopoulos J., Tsaballa A., Xanthopoulou A., Madaris P., Tsaftaris A. Sweet cherry cultivar identification by high-resolution-melting (HRM) analysis using gene-based SNP markers // Plant Molecular Biology Reporter. 2013. No. 31 (3). P. 763–768.

21. Крутовский К.В. От популяционной генетике к популяционной геномике лесных древесных видов: интегрированный популяционно-геномный подход // Генетика. 2006. Т. 42 (10). С. 1304–1318.

22. Пименов А.В., Седельникова Т.С. Биоразнообразие хвойных на болотах Западной Сибири // Торфяники Западной Сибири и цикл углерода: прошлое и настоящее: Материалы Второго международного полевого симпозиума. Томск, 2007. С. 76–77.

23. Savinykh N.P., Lelekova E.V., Shakleina M.N. About the promotion of natural restoration of *Pinus sylvestris* L. // Теоретическая и прикладная экология. 2018. № 4. С. 108–113.

24. Шигапов З.Х., Шигапова А.И., Уразбахтина К.А. Генетическая изменчивость и популяционная структура на лиственницы на Урале // Вестник ОГУ. 2009. № 6 (194). С. 438–440.

References

1. Altukhov Y.P. Dynamics of gene pools under anthropogenic influences // Vestnik VOGiS. 2004. V. 8. No. 2. P. 40–59 (in Russian).

2. Boronnikova S.V. Molecular genetic analysis and assessment of the state of gene pools of plant species of the Perm region. Perm': Perm state research university, 2013. 223 p. (in Russian).

3. Dynamics of population gene pools under anthropogenic influences / Ed. Yu.P. Altukhov. Moskva: Nauka, 2004. 619 p. (in Russian).

4. Krutovskiy K.V. Prospects for the use of genomic research in forestry // Sibirskiy lesnoy zhurnal. 2014. No. 4. P. 11–15 (in Russian).

5. Goncharenko G.G., Padutov V.E., Potenko V.V. Guide to the study of coniferous species by electrophoretic analysis of isoenzymes. Gomel': BelNIILKH, 1989. 164 p. (in Russian).

6. Brookes A.J. The essence of SNP // Gene. 1999. V. 234. P. 177–186.

7. Heinze B., KozielMonte A., Jahn D. Analysis of variation in chloroplast DNA sequences // Methods in molecular biology: Methods and Protocols. 2014. V. 1115. P. 85–120.

8. Pyhäjärvi T., García-Gil M.R., Knürr T. Demographic history has influenced nucleotide diversity in European *Pinus sylvestris* populations // Genetics. 2007. V. 177. P. 1713–1724.

9. Wachowiak W., Balk P.A., Savolainen O. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // Tree Genetics & Genomes. 2009. V. 5. No. 1. P. 117–132.

10. Vidyakin A.I., Boronnikova S.V., Nechayeva Yu.S., Prishnevskaya Ya.V., Boboshina I.V. Genetic variability, structure and differentiation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in the northeast of the Russian Plain according to molecular genetic analysis // Genetika. 2015. V. 51. No. 12. P. 1401–1409 (in Russian).

11. Gonzalez-Martinez S.C., Wheeler N.C., Ersoz E. Association genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood property traits // Genetics. 2007. V. 175. P. 399–409.

12. Chhatre V.E., Byram T.D., Neale D.B., Wegrzyn J.L., Krutovsky K.V. Genetic structure and association mapping of adaptive and selective traits in the East Texas loblolly pine (*Pinus taeda* L.) breeding populations // Tree Genetics & Genomes. 2013. V. 9. No. 5. P. 1161–1178.

13. Vangestel C., Vázquez-Lobo A., Martínez-García P.J., Vangestel C., Vázquez-Lobo A., Martínez-García P.J., Calic I., Wegrzyn J.L., Neale D.B. Patterns of neutral and adaptive genetic diversity across the natural range of sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) // *Tree Genetics & Genomes*. 2016. V. 12. P. 51.
14. Heuertz M., De Paoli E., Källman T., Larsson H., Jurman I, Morgante M, Lascoux M, Gyllenstrand N. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst) // *Genetics*. 2006. V. 174. P. 2095–2105.
15. Wei X.-X., Wang X.-Q. Recolonization and radiation in *Larix* (Pinaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA paralogues // *Mol. Ecology*. 2004. No. 13. P. 3115–3123.
16. Khatab I.A., Ishiyama H., Inomata N., Wang X.-R., Szmidt A.E. Phylogeography of Eurasian *Larix* species inferred from nucleotide variation in two nuclear genes // *Genes Genet. Syst.* 2008. No. 83. P. 55–56.
17. Chibilov A.A. Physical and geographical zoning of the Southern Urals as the basis for the formation of the ecological framework of the region // *Steppes of Northern Eurasia: Proceedings of the Seventh International Symposium*. Orenburg, 2015. P. 916–919 (in Russian).
18. Ryabinina Z.N. Summary of the flora of the Orenburg region. Ekaterinburg: Ural Branch of the Institute of Steppe of the Russian Academy of Sciences. 1998. 163 p. (in Russian).
19. Farjon A. Conifers. Royal Botanic Gardens Kew. 2001. 309 p.
20. Ganopoulos J., Tsaballa A., Xanthopoulou A. Sweet cherry cultivar identification by High-Resolution-Melting (HRM) analysis using gene-based SNP markers // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2013. V. 31. No. 3. P. 763–768. doi: 10.1007/s11105-012-0538
21. Krutovskiy K.V. From population genetics to population genomics of forest tree species: an integrated population-genomic approach // *Genetika*. 2006. V. 42. No. 10. P. 1304–1318 (in Russian).
22. Pimenov A.V., Sedelnikova T.S. Coniferous biodiversity in the swamps of Western Siberia // *Peatlands of Western Siberia and the carbon cycle: past and present: materials of the Second International Field Symposium*. Tomsk, 2007. P. 76–77 (in Russian).
23. Savinykh N.P., Lelekova E.V., Shakleina M.N. About the promotion of natural restoration of *Pinus sylvestris* L. // *Theoretical and Applied Ecology*. 2018. No. 4. P. 108–113 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2018-4-108-113
24. Shigapov Z.K., Shigapova A.I., Urazbakhtina K.A. Genetic variation and population structure in the Ural larches // *Vestnik OGU*. 2009. No. 6. P. 438–440 (in Russian).