

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*P. SYLVESTRIS* L.) В СРЕДНЕЙ СИБИРИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

М.А. Шеллер^{1, 2, *}, Е. Чиокырлан², П.В. Михайлов¹,
С.С. Кулаков^{1, 3}, Н.Н. Кулакова¹, А.А. Ибе¹, Т.В. Сухих¹,
А.Л. Курту²

¹ Сибирский государственный университет науки и технологий имени акад. М.Ф. Решетнёва, Красноярск, Россия; ² Трансильванский университет Брашова, Румыния; ³ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

* Эл. почта: maralexsheller@mail.ru

Статья поступила в редакцию 08.10.2023; принята к печати 26.11.2023

Сосна обыкновенная – одна из основных лесобразующих пород России. Мы оценили генетическое разнообразие и дифференциацию естественных популяций сосны обыкновенной в Средней Сибири, используя микросателлитный анализ хлоропластной ДНК. Всего было выявлено 87 гаплотипов. В большинстве случаев (77) гаплотип встречался только один раз. Высокий уровень гаплотипического разнообразия ($H_{cp} = 0,993$) был выявлен во всех изученных популяциях. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что генетическая дифференциация между популяциями составила только 3%. Полученные результаты могут быть использованы в мониторинге состояния генетических ресурсов сосны обыкновенной в Средней Сибири.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, Средняя Сибирь, генетическое разнообразие, микросателлитный анализ хлоропластной ДНК.

GENETIC DIVERSITY OF SCOTS PINE (*P. SYLVESTRIS* L.) IN MIDDLE SIBERIA ASSESSED BY ANALYSIS OF VARIABILITY OF CHLOROPLAST MICROSATELLITE LOCI

M.A. Sheller^{1, 2, *}, E. Ciocirlan², P.V. Mikhailov¹, S.S. Kulakov^{1, 3}, N.N. Kulakova¹, A.A. Ibe¹,
T.V. Sukhikh¹, A.L. Curtu²

¹ Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russia; ² Transilvania University of Brasov, Romania; ³ Sukachev Institute of Forest, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

E-mail: maralexsheller@mail.ru

Scots pine is one of the main forest-forming tree species in Russia. We assessed the genetic diversity and differentiation of natural Scots pine populations in Middle Siberia using chloroplast microsatellite (cpSSR) loci. A total of 87 haplotypes have been detected. Most of them (77) were detected only once. High level of haplotype diversity ($H_{cp} = 0.993$) was observed in all populations studied. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that only 3% of the total variation occurred among populations. The results may be used in monitoring of the state of Scots pine genetic resources in Middle Siberia.

Keywords: Scots pine, Middle Siberia, genetic diversity, microsatellite analysis of chloroplast DNA.

Введение

Генетическое разнообразие имеет важное значение для сохранения видов. Высокий уровень генетического разнообразия улучшает способность видов адаптироваться к изменяющимся условиям среды, повышает

устойчивость к заболеваниям и способствует успешному воспроизводству [12–14, 19].

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – одна из наиболее распространенных древесных пород в бореальных лесах Евразии – имеет большое экологиче-

ское и социально-экономическое значение [8, 15, 19, 24, 26]. В России сосновые леса сосредоточены в Сибири, где на их долю приходится до 30% всех хвойных лесов [1]. Сосновые леса находятся на первом месте по площади вырубок и объему вырубаемой древесины в России [3]. В то же время процессы лесовосстановления носят пассивный характер, часто значительно затягиваются и протекают с нежелательной сменой древесных пород [3]. Из-за природных и антропогенных факторов площадь сосновых лесов в России за последние десять лет сократилась на 2 млн га [23]. Таким образом, изучение генетического разнообразия сосны обыкновенной в России имеет важное значение для разработки программ по сохранению данного вида, а также для мониторинга состояния лесных генетических ресурсов Сибири [2, 5].

В настоящее время генетическое разнообразие лесных древесных растений интенсивно изучается с использованием молекулярных маркеров [23]. Хлоропластные микросателлиты (cpSSR) являются одними из универсальных и эффективных молекулярных маркеров, которые используются при оценке генети-

ческого разнообразия и структуры популяций, а также в филогенетических исследованиях [7, 10, 17, 20]. Эти маркеры уже длительное время применяются и для оценки генетических ресурсов сосны обыкновенной [6, 18, 25].

В данном исследовании мы использовали микросателлитные маркеры хлоропластной ДНК для оценки генетического разнообразия десяти естественных популяций сосны обыкновенной в Средней Сибири.

Материалы и методы

Объектами исследования являются 10 популяций сосны обыкновенной, произрастающих на территории Красноярского края (рис. 1). В каждой популяции случайным образом было выбрано по десять взрослых деревьев. Отобранная с деревьев хвоя хранилась в силикагеле до выделения ДНК.

Геномную ДНК выделяли из высушенной хвои СТАВ-методом [9]. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Все образцы ДНК были доведены до концентрации 10 нг/мкл. Молеку-

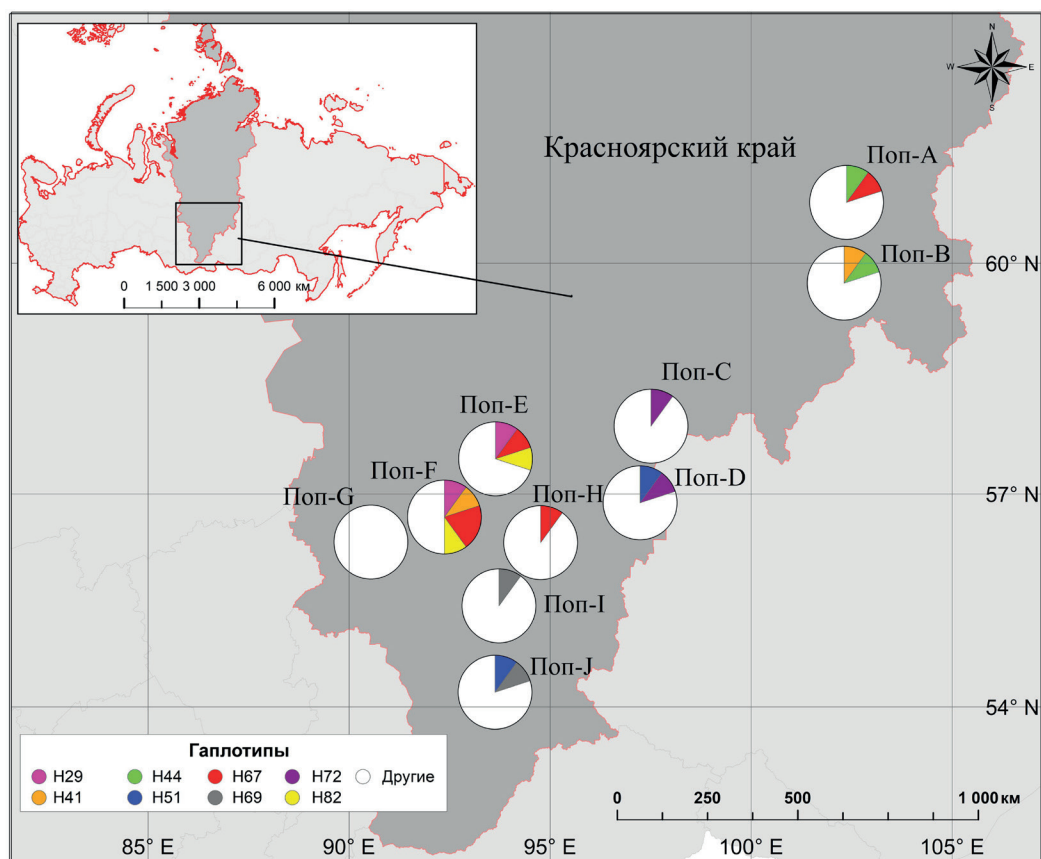


Рис. 1. Расположение популяций сосны обыкновенной в Средней Сибири и частоты восьми наиболее распространенных гаплотипов в изученных популяциях

лярный анализ был проведен с использованием десяти микросателлитных хлоропластных маркеров: РСР45071, РСР36567, РСР48256, РСР41131, РСР30277, РСР26106, Pt1254, Pt15169, Pt71936, Pt87268 [18, 27]. Амплификацию проводили в двух мультиплексных реакциях с использованием набора Qiagen Multiplex PCR (Qiagen, Германия) в условиях, рекомендованных производителем: начальная денатурация в течение 15 мин при 95 °С, затем 30 циклов по 15 с при 94 °С, 1 мин 30 с при 60 °С (для набора из 6 локусов РСР) и 58 °С (для набора из 4 локусов Pt), 1 мин 30 с при температуре 72 °С и заключительная элонгация 10 мин при температуре 72 °С. Амплифицированные фрагменты анализировали на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

HAPLOTYPE ANALYSIS 1.05 [11] использовался для оценки следующих параметров генетического разнообразия: число гаплотипов (*A*); количество частных гаплотипов (*P*); эффективное число гаплотипов

(N_E); гаплотипическое разнообразие (H_{CP}) и среднее значение генетических расстояний между индивидами в популяции (D^2_{sh}).

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) был проведен с использованием GenAlEx версии 6.5 [16]. Статистическая значимость теста AMOVA была рассчитана для всех популяций и локусов на основе 999 пермутаций.

Результаты

Анализ микросателлитных локусов хлоропластной ДНК у 10 деревьев сосны обыкновенной выявил 87 гаплотипов. В большинстве случаев (77) гаплотип встречался только один раз. Наибольшее количество частных гаплотипов (десять) было обнаружено в популяции Поп-Г, а наименьшее (пять) – в популяции Поп-Ф (табл. 1).

Гаплотип Н67 был обнаружен в 4 из 10 исследуемых популяций (Поп-А, Поп-Е, Поп-Ф, Поп-Н) (рис. 1, табл. 2).

Табл. 1

Основные показатели генетической изменчивости популяций сосны обыкновенной

(*N* – размер выборки; *A* – число гаплотипов; *P* – число частных гаплотипов; N_E – эффективное число гаплотипов; H_{CP} – гаплотипическое разнообразие; D^2_{sh} – среднее значение генетических расстояний между индивидами в популяции)

Популяция	Показатель				
	<i>A</i>	<i>P</i>	N_E	H_{CP}	D^2_{sh}
Поп-А	10	8	10,000	1,000	4,169
Поп-В	10	8	10,000	1,000	5,316
Поп-С	10	9	10,000	1,000	4,382
Поп-Д	8	6	7,143	0,956	4,473
Поп-Е	10	7	10,000	1,000	5,024
Поп-Ф	9	5	8,333	0,978	5,433
Поп-Г	10	10	10,000	1,000	4,322
Поп-Н	10	9	10,000	1,000	3,716
Поп-И	10	9	10,000	1,000	4,409
Поп-Ж	10	8	10,000	1,000	7,522
Среднее	9,700	7,900	9,548	0,993	4,877

Табл. 2

Частоты восьми наиболее распространенных гаплотипов в 10 популяциях сосны обыкновенной в Средней Сибири

Гаплотип	Популяция									
	А	В	С	Д	Е	Ф	Г	Н	И	Ж
Н29					0,1	0,1				
Н41		0,1				0,1				
Н44	0,1	0,1								
Н51				0,1						0,1
Н67	0,1				0,1	0,2		0,1		
Н69									0,1	0,1
Н72			0,1	0,1						
Н82					0,1	0,1				

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA)

Источник изменчивости	Степень свободы	Сумма квадратов отклонений	Компоненты изменчивости	Изменчивость, %
Между популяциями	9	27,820	0,069	3
В пределах популяций	90	215,700	2,397	97
Всего	99	243,520	2,466	100

Внутрипопуляционный анализ показал, что все исследуемые популяции характеризуются высоким уровнем гаплотипического разнообразия ($H_{CP} = 0,956–1,000$) (табл. 1). Эффективное число гаплотипов на популяцию варьировало от 7,143 до 10, а среднее значение генетических расстояний между индивидами – от 3,716 (Поп-Н) до 7,522 (Поп-Л). AMOVA-анализ показал, что основная часть генетической дисперсии, обнаруженной на основе исследования хлоропластных микросателлитных локусов, приходится на изменчивость внутри популяций (97%), межпопуляционная доля составляет 3% ($\Phi_{iPT} = 2,8\%$, $p = 0,02$) (табл. 3).

Обсуждение

Высокий уровень гаплотипического разнообразия ($H_{CP} = 0,993$) был выявлен во всех исследуемых популяциях сосны обыкновенной в Средней Сибири. Полученные результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями в Европе и Азии. Например, высокий уровень гаплотипического разнообразия ($H_{CP} = 0,991$) был выявлен в семи популяциях сосны обыкновенной из Шотландии и в восьми популяциях из континентальной Европы [18], а также в 38 популяциях сосны обыкновенной из Азии и Восточной Европы ($H_{CP} = 0,984$) [4]. Более низкие значения H_{CP} были обнаружены в 13 популяциях сосны обыкновенной из Испании ($H_{CP} = 0,978$) [21] и в четырех популяциях из северной части Италии ($H_{CP} = 0,92$) [22]. Высокое гаплотипическое разнообразие, наблюдаемое у исследуемых популяций сосны обыкновенной, можно объяснить интенсивным потоком генов между популяциями. В данном исследовании это может быть подтверждено присутствием гаплотипа H67 в 4 из 10 исследуемых популяций.

Низкий уровень генетической дифференциации популяций сосны обыкновенной в Средней Сибири был выявлен с помощью AMOVA-анализа ($\Phi_{iPT}=3\%$), что согласуется с результатами других исследований [4, 18]. Низкая дифференциация между исследуемыми популяциями может свидетельствовать об их общей филогеографической истории.

Полученные результаты показывают, что популяции сосны обыкновенной в Средней Сибири характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия и низким уровнем генетической дифференциации.

Заключение

Оценка генетического разнообразия 10 популяций сосны обыкновенной на территории Средней Сибири выявила высокий уровень генетического разнообразия в исследуемых популяциях и низкую степень генетической дифференциации между ними. Полученные результаты могут быть использованы в мониторинге состояния генетических ресурсов сосны обыкновенной на территории Средней Сибири.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России на выполнение коллективом научной лаборатории «Защита леса» проекта «Фундаментальные основы защиты лесов от энтомо- и фитовредителей в Сибири» (№ FEFE-2020-0014).

Благодарности. Авторы выражают особую благодарность Красноярскому региональному центру коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН за предоставленное оборудование для обеспечения выполнения проекта «Фундаментальные основы защиты лесов от энтомо- и фитовредителей в Сибири» (№ FEFE-2020-0014).

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Иванова ГА, Кукавская ЕА, Жила СВ. Воздействие пожаров на параметры баланса углерода и компоненты экосистемы в светлохвойных лесах средней Сибири. *Интерэкспо Гео-Сибирь*. 2010;4(2):54-8.
2. Ильинов АА, Раевский БВ. Состояние генофонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии. *Сибирский лесной журнал*. 2016;5:45-54.
3. Маркатюк АА, Рунова ЕМ, Гаврилин ИИ, Ведерников ИБ. Современное состояние бореаль-

- ных лесов Восточной Сибири в аспекте естественного возобновления сосны обыкновенной. Системы Методы Технологии. 2013;1(17):163-9.
4. Семериков ВЛ, Семерикова СА, Дымшакова ОС, Зацепина КГ, Тараканов ВВ, Тихонова ИВ, Экарт АК, Видякин АИ, Жамьянсурен С, Роговцев РВ, Кальченко ЛИ. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Азии и Восточной Европе. Генетика. 2014;50(6):577-85.
 5. Торбик ДН, Бедрицкая ТВ, Власова ММ, Синельников ИГ. Генетическое разнообразие естественных популяций *Pinus sylvestris*. В кн.: Демидов НА, ред. Труды Федерального бюджетного учреждения «Северный научно-исследовательский институт лесного хозяйства». Архангельск; 2019. С. 91-9.
- Общий список литературы/References**
1. Ivanova GA, Kukavskaya EA, Zhila SV. [Fire impact on carbon balance parameters and ecosystem components of light-coniferous forests of central Siberia]. Interekspo Geo-Sibir. 2010;4(2):54-8. (In Russ.)
 2. Ilyin AA, Raevsky BV. [The current state of *Pinus sylvestris* L. gene pool in Karelia]. Sibirskiy Lesnoy Zhurnal. 2016;5:45-54. (In Russ.)
 3. Markatiuk AA, Runova YeM, Gavrilin II, Vedernikov IB. [Current state of East Siberian boreal forests in the aspect of natural *Pinus sylvestris* L. regeneration systems]. Sistemy Metody Tekhnologii. 2013;1(17):163-9. (In Russ.)
 4. Semerikov VL, Semerikova SA, Dymshakova OS, Zatssepina KG, Tarakanov VV, Tikhonova IV, Ekart AK, Vidiakin AI, Jamyansuren S, Rogovtsev RV, Kalchenko LI. [Microsatellite loci polymorphism of chloroplast DNA of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Asia and Eastern Europe]. Genetika. 2014;50(6):577-85. (In Russ.)
 5. Torbik DN, Bedrickaya TV, Vlasova MM, Sinelnikov IG. [Genetic Diversity of Natural Populations of *Pinus sylvestris*]. In: Demidov NA, ed. Trudy Federalnogo Biudzhethnogo Uchrezhdeniya «Severnii Nauchno-issledovatel'skiy Institut Lesnogo Kyoziyastva». Arkhangel'sk; 2019. P. 91-9. (In Russ.)
 6. Bernhardsson C, Floran V, Ganea SL and García-Gil MR. Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution. Forest Ecol Manag. 2016;361:131-43.
 7. Cui B, Deng P, Zhang S, Zhao Z. Genetic diversity and population genetic structure of ancient *Platycladus orientalis* L. (Cupressaceae) in the middle reaches of the Yellow River by chloroplast microsatellite markers. Forests 2021;12:592.
 8. Dering M, Kosiński P, Wyka T P, Pers-Kamczyc E, Boratyński A, Boratyńska K, Reich P B, Romo A, Zadworny M, Żytkowiak R, Oleksyn J. Tertiary remnants and Holocene colonizers: Genetic structure and phylogeography of Scots pine reveal higher genetic diversity in young boreal than in relict Mediterranean populations and a dual colonization of Fennoscandia. Diversity Distrib. 2017;23:540-55.
 9. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1990;12:13-5.
 10. Ebert D, Peakall R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): Technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. Mol Ecol Resour. 2010;9:673-90.
 11. Eliades N-G, Eliades DG. HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotypes data. Distributed by the authors. Goettingen: Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University; 2009.
 12. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of the World's Forest Genetic Resources. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome; 2014.
 13. González-Díaz P, Cavers S, Iason G R, Booth A, Russell J, Jump AS. Weak isolation by distance and geographic diversity gradients persist in Scottish relict pine forest. iForest. 2018;11:449-58.
 14. Ivetić V, Devetaković J, Nonić M, Stanković D, Šijačić-Nikolić M. Genetic diversity and forest reproductive material – from seed source selection to planting. iForest. 2016;9:801-12.
 15. Naydenov K, Senneville S, Beaulieu J, Tremblay F, Bousquet J. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor. BMC Evol Biol. 2007;7(1):233.
 16. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes. 2006;6:288-95.
 17. Porth I, El-Kassaby YA. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. Diversity. 2014;6:283-95.
 18. Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, McNicol JW, Forrest GI, Cottrell J, Powell W. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple sequence repeats. Proc Roy Soc L Ser B. 1998;265:1697-705.
 19. Przybylski P, Tereba A, Meger J, Szyp-Borowska I, Tyburski Ł. Conservation of genetic diversity of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in a Central European national park based on cpDNA. Stud Divers. 2022;14(2):93.

20. Rai KC, Ginwal HS. Microsatellite analysis to study genetic diversity in Khasi Pine (*Pinus Kesiya* Royle Ex. Gordon) using chloroplast SSR markers. *Silvae Genet.* 2018;67:99-105.
21. Robledo-Arnuncio JJ, Collada C, Alia R, Gil L. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *J Biogeogr.* 2005;32(4):595-605.
22. Scalfi M, Piotti A, Rossi M, Piovani P. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: The rear edge of the range. *Eur J Forest Res.* 2009;128:377-86.
23. Sheller M, Ciocîrlan E, Mikhaylov P, Kulakov S, Kulakova N, Ibe A, Sukhikh T, Curtu AL. Chloroplast DNA Diversity in Populations of *P. sylvestris* L. from Middle Siberia and the Romanian Carpathians. *Forests.* 2021;12:1757.
24. Şofletea N, Mihai G, Ciocîrlan E, Curtu AL. Genetic diversity and spatial genetic structure in isolated Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) populations native to eastern and southern Carpathians. *Forests.* 2020;11(10):1047.
25. Urbaniak L, Wojnicka-Półtorak A, Celiński K, Lesiczka P, Pawlaczyk E. Genetic resources of relict populations of *Pinus sylvestris* (L.) in Western Carpathians assessed by chloroplast microsatellites. *Biologia.* 2019:1-10.
26. Vasilyeva Y, Chertov N, Nechaeva Y, Sboeva Y, Pystogova N, Boronnikova S, Kalendar R. Genetic structure, differentiation and originality of *Pinus sylvestris* L. populations in the east of the East European Plain. *Forests.* 2021;12:999.
27. Vendramin GG, Lelli L, Rossi P, Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol Ecol.* 1996;5:111-4.

