

УДК 575.2:575.22:574.3  
AGRIS F30

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/65/01>

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L.  
И *PINUS SIBIRICA* DU TOUR В ПЕРМСКОМ КРАЕ НА ОСНОВАНИИ  
ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-PCR МАРКЕРОВ**

©**Нечаева Ю. И.**, ORCID: 0000-0003-0837-4149, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, [ulia-2012@mail.ru](mailto:ulia-2012@mail.ru)

©**Пыстогова Н. А.**, ORCID: 0000-0003-4420-880X, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, [n.pystogova9@gmail.com](mailto:n.pystogova9@gmail.com)

©**Чертов Н. В.**, ORCID: 0000-0003-0250-220X, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, [super.gall@mail.ru](mailto:super.gall@mail.ru)

©**Боронникова С. В.**, ORCID: 0000-0002-5498-8160, д-р биол. наук,  
Пермский государственный национальный исследовательский университет,  
г. Пермь, Россия, [SVBoronnikova@yandex.ru](mailto:SVBoronnikova@yandex.ru)

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF *PINUS SYLVESTRIS* L.  
AND *PINUS SIBIRICA* DU TOUR POPULATIONS IN PERM KRAI BASED  
ON POLYMORPHISM ISSR-PCR MARKERS**

©**Nechaeva Yu.**, ORCID: 0000-0003-0837-4149, Perm State University,  
Perm, Russia, [ulia-2012@mail.ru](mailto:ulia-2012@mail.ru)

©**Pystogova N.**, ORCID: 0000-0003-4420-880X, Perm State University,  
Perm, Russia, [n.pystogova9@gmail.com](mailto:n.pystogova9@gmail.com)

©**Chertov N.**, ORCID: 0000-0003-0250-220X, Perm State University,  
Perm, Russia, [super.gall@mail.ru](mailto:super.gall@mail.ru)

©**Boronnikova S.**, ORCID: 0000-0002-5498-8160, Dr. habil., Perm State University,  
Perm, Russia, [SVBoronnikova@yandex.ru](mailto:SVBoronnikova@yandex.ru)

**Аннотация.** Изучен полиморфизм ДНК, определены показатели генетического разнообразия и генетической структуры 3 популяций *Pinus sylvestris* L. и 3 популяций *Pinus sibirica* Du Tour в Пермском крае. В популяциях *P. sibirica* обнаружено 102 ISSR-PCR маркера, из которых 88 были полиморфными ( $P_{95} = 0,863$ ), а в популяциях *P. sylvestris* — 113 ISSR-PCR маркеров, при этом 100 из них являлись полиморфными ( $P_{95} = 0,885$ ). Популяции двух исследуемых видов древесных растений характеризуются высоким генетическим разнообразием. При этом у *P. sibirica* показатели генетического разнообразия оказались незначительно выше ( $H_E = 0,195$ ;  $n_e = 1,335$ ;  $n_a = 1,330$ ), чем у *P. sylvestris* ( $H_E = 0,166$ ;  $n_e = 1,268$ ;  $n_a = 1,212$ ). Анализ генетической структуры показал, что коэффициенты генетической подразделенности ( $G_{ST}$ ) у двух изученных видов рода *Pinus* близки и составляют 0,320 у *P. sibirica* и 0,303 у *P. sylvestris*. Популяции сосны сибирской и сосны обыкновенной характеризуются средней степенью генетической дифференциации, поскольку на долю межпопуляционной компоненты приходится 32,0% и 30,3% генетического разнообразия этих видов соответственно. С помощью теста Мантел установлена высокая корреляция ( $R^2 = 0,6871$ ) между генетическими и географическими расстояниями у популяций *P. sibirica*. Полученные данные актуальны для сохранения генофондов изученных двух видов рода *Pinus* в Пермском крае.

**Abstract.** DNA polymorphism has been studied, indicators of genetic diversity and genetic structure of 3 populations of *Pinus sylvestris* L. and 3 populations of *Pinus sibirica* Du Tour in the Perm Krai have been determined. In the populations of *P. sibirica*, 102 ISSR-PCR markers were found, of which 88 were polymorphic ( $P_{95} = 0.863$ ), and in the populations of *P. sylvestris* — 113 ISSR-PCR markers, 100 of which were polymorphic ( $P_{95} = 0.885$ ). The populations of the two studied species of woody plants are characterized by high genetic diversity. At the same time, in *P. sibirica*, the indices of genetic diversity were slightly higher ( $H_E = 0.195$ ;  $n_e = 1.335$ ;  $n_a = 1.330$ ) than in *P. sylvestris* ( $H_E = 0.166$ ;  $n_e = 1.268$ ;  $n_a = 1.212$ ). The analysis of the genetic structure showed that the coefficient of genetic subdivision ( $G_{ST}$ ) in the two studied species of the genus *Pinus* are similar and amount to 0.320 in *P. sibirica* and 0.303 in *P. sylvestris*. The populations of Siberian pine and Scots pine are characterized by an average degree of genetic differentiation, since the interpopulation component accounts for 32.0% and 30.3% of the genetic diversity of these species, respectively. Using the Mantel test, a high correlation was found between genetic and geographical distances in *P. sibirica* populations ( $R^2 = 0.6871$ ), while *P. sylvestris* showed a low correlation ( $R^2 = 0.0649$ ). The data obtained are relevant for the preservation of the gene pools of the studied two species of the genus *Pinus* in the Perm Krai.

**Ключевые слова:** генетическое разнообразие, генетическая структура, ISSR-PCR маркеры, *Pinus sylvestris* L., *Pinus sibirica* Du Tour, Пермский край.

**Keywords:** genetic diversity, genetic structure, ISSR-PCR markers, *Pinus sylvestris* L., *Pinus sibirica* Du Tour, Perm Krai.

### Введение

Генетическое разнообразие и внутривидовая дифференциация имеют важное биосферное и ресурсное значение. Для решения современных проблем сохранения и возобновления лесов необходима оценка биоразнообразия лесных экосистем, важным элементом которой является изучение генетического разнообразия популяций основных лесобразующих видов растений [1]. Разработка и обоснование комплекса мероприятий, направленных на максимальное сохранение генетического разнообразия лесобразующих видов в различных условиях должна основываться на данных о генетической структуре и состоянии генофондов их популяций [2].

Сосна сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) и сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) являются ценными хозяйственными видами, а также одними из основных эдификаторов лесных экосистем бореальной зоны Евразии. Высокая экологическая пластичность и хозяйственная ценность сосны сибирской и сосны обыкновенной давно привлекают внимание генетиков и селекционеров к проблеме изучения, сохранения и воспроизводства генофондов этих видов.

Цель работы — сравнительный анализ генетического разнообразия и генетической структуры популяций *P. sylvestris* и *P. sibirica* в Пермском крае на основании полиморфизма межмикросателлитных маркеров.

### Материалы и методы исследований

В качестве объектов для сравнительного анализа генетического разнообразия и генетической структуры избраны популяции двух видов древесных растений (*Pinus*

*sylvestris* L. и *Pinus sibirica* Du Tour; *Pinaceae*), расположенные в центральной и северной частях Пермского края. Исследованы 3 популяции сосны сибирской (*P. sibirica*), расположенные в Красновишерском лесничестве (*Ps\_Kr*), Кочевском лесничестве (*Ps\_Kh*) и на территории ФГБУ «Государственный заповедник «Басеги»» (*Ps\_Bs*) (Таблица 1). Среди изученных популяций сосны сибирской на наибольшем географическом расстоянии (268 км) находятся популяции *Ps\_Kh* и *Ps\_Bs*, а на наименьшем — *Ps\_Kr* и *Ps\_Bs* (176 км). Исследованные три популяции *P. sylvestris* находятся на территории Березниковского лесничества (*Psl\_Br*), Закамского лесничества (*Psl\_Zc*) и Кишертского (*Psl\_Ks*) лесничества (Таблица 1). При этом наиболее географически удаленными являются популяции *Psl\_Br* и *Psl\_Ks* (260 км), а на наименьшем географическом расстоянии находятся популяции *Psl\_Ks* и *Psl\_Zc* (105 км).

Таблица 1.

ИЗУЧЕННЫЕ ПОПУЛЯЦИИ *P. SIBIRICA* И *P. SYLVESTRIS*

Обозначение популяций	Расположение популяций	Объем выборки, шт.	Координаты (с. ш.; в. д.)
<i>Ps_Kr</i>	Красновишерский район, Красновишерское лесничество	17	N: 60.11 E: 57.44
<i>Ps_Kh</i>	Кочевский район, Кочевское лесничество	30	N: 59.39 E: 54.39
<i>Ps_Bs</i>	Горнозаводский район, Государственный заповедник «Басеги», Горнозаводское лесничество	29	N: 58.56 E: 58.30
<i>Psl_Ks</i>	Кишертский район, Кишертское лесничество	28	N:57.08 E:57.23
<i>Psl_Br</i>	г. Березники, Березниковское лесничество	28	N:59.40 E:56.70
<i>Psl_Zc</i>	Пермский район, Закамское лесничество,	28	N:57.96 E:56.16

Примечание: популяции *P. sibirica*: *Ps\_Kr* — расположена в Красновишерском лесничестве; *Ps\_Kh* — в Кочевском лесничестве; *Ps\_Bs* — в Горнозаводском лесничестве; популяции *P. sylvestris*: *Psl\_Ks* — из Кишертского лесничества; *Psl\_Br* — из Березниковского лесничества; *Psl\_Zc* — из Закамского лесничества; с. ш. — северная широта; в. д. — восточная долгота.

Для проведения молекулярно-генетических исследований были собраны образцы хвои в 6 популяциях *P. sibirica* и *P. sylvestris* с 106 деревьев. Сбор образцов осуществлялся со случайно выбранных деревьев, расположенных на расстоянии не менее 100 метром друг от друга. ДНК из хвои выделяли по методике С. Роджерса [3], модифицированной с использованием в качестве сорбента PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) [4]. Качество и характеристики ДНК определяли на приборе Spectrofotometr<sup>TM</sup>NanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA). Для оценки генетического разнообразия и генетической структура популяций был применен ISSR- (Inter Simple Sequence Repeats) метод анализа полиморфизма ДНК [5]. Для проведения ПЦР были использованы эффективные для *P. sibirica* ISSR-PCR праймеры, которые были подобраны ранее [6]: ISSR-9 [(ACG)<sub>7</sub>G]; CR-217 [(GT)<sub>6</sub>GG]; CR-215 [(CA)<sub>6</sub>GT]; M1 [(AC)<sub>8</sub>CG]; X11 [(AGC)<sub>6</sub>G]. Для ПЦР с пробами ДНК *P. sylvestris* также использовались ранее подобранные эффективные праймеры [7]: ISSR-1 [(AC)<sub>8</sub>T]; CR-212 [(CT)<sub>8</sub>TG]; CR-215 [(CA)<sub>6</sub>GT]; M27 [(GA)<sub>8</sub>C]; X10 [(AGC)<sub>6</sub>C].

Для ПЦР использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую: 0,4 мкл Tag-полимеразы; 2,5 мкл стандартного 10× буфера для ПЦР; 0,25 мкл праймера; 2,5 мкл Mg<sup>2+</sup>;

0,25 мкл dNTP; 5 мкл тотальной ДНК. В качестве отрицательного контроля (К-) для проверки чистоты реактивов к реакционной смеси вместо ДНК добавляли 5 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) по типичной для ISSR-PCR метода программе: предварительная денатурация 94 °С, 2 мин.; первые пять циклов 94 °С, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72 °С, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94 °С, 5 сек.; t° отжига, 5 сек.; 72 °С, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72 °С. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 52 °С до 64 °С. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1× TBE буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе Gel-Doc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 + bp+DNA Ladder; ЗАО «Евроген», Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы QuantityOne в системе гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, USA). Изучен полиморфизм 102 ISSR-PCR маркеров в 3 популяциях *P. sibirica* и 113 ISSR-PCR маркеров в 3 популяциях *P. sylvestris*.

Компьютерная обработка данных проведена с помощью программы POPGENE 1.31 [8] и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 [9] для MS-Excel с определением: доли полиморфных локусов ( $P_{95}$ ) [10], абсолютного числа аллелей ( $n_a$ ), эффективного числа аллелей ( $n_e$ ) [11], ожидаемой гетерозиготности ( $H_E$ ) [12]. Анализ генетической структуры проведен в соответствии с методикой М. Нея [13]. Генетическое расстояние между популяциями определяли по формуле М. Нея и В. Ли [14]. Была рассчитана матрица генетических различий, на основании которой невзвешенным парно-групповым методом UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic average) была построена дендрограмма, отражающая степень сходства исследуемых популяций по ISSR-спектрам при помощи компьютерных программ Treecron 1.3b. Для определения корреляции между генетическими и географическими расстояниями был применен общепринятый тест Мантелла [15].

### Результаты и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического анализа популяций *P. sibirica* выявлено 102 ISSR-PCR маркера, из которых 88 были полиморфными ( $P_{95}=0,863$ ). В ходе анализа полиморфизма ДНК популяций *P. sylvestris* было обнаружено 113 ISSR-PCR маркеров (Таблица 2), из которых 100 являлись полиморфными ( $P_{95}=0,885$ ). Соответственно, доля полиморфных локусов незначительно выше у изученных популяций *P. sylvestris*.

Число амплифицированных ISSR-PCR маркеров у *P. sibirica* варьировало в зависимости от праймера от 17 (M1 [(AC)<sub>8</sub>CG]) до 25 (X11 [(AGC)<sub>6</sub>G]). В популяциях *P. sylvestris* максимальное число ISSR-PCR маркеров, равное 27, выявлено в ПЦР с праймером CR-212 [(CT)<sub>8</sub>TG], а минимальное (20) с праймерами ISSR-1 [(AC)<sub>8</sub>T] и M27 [(GA)<sub>8</sub>C]. Размеры ISSR-PCR маркеров в исследованных популяциях *P. sibirica* изменялись (Таблица 2) в зависимости от праймера в пределах от 190 п.н. (M1 [(AC)<sub>8</sub>CG]) до 1570 п.н. (CR-217 [(GT)<sub>6</sub>GG]). В популяциях *P. sylvestris* размеры амплифицированных ISSR-PCR маркеров варьировали в зависимости от праймера от 210 п.н. (X10 [(AGC)<sub>6</sub>C]) до 1400 п.н. (CR-212 [(CT)<sub>8</sub>TG]). Ожидаемая гетерозиготность ( $H_E$ ) у *P. sibirica* составила 0,195, что незначительно превышает значения этого показателя у *P. sylvestris* ( $H_E=0,166$ ).

Таблица 2.

ХАРАКТЕРИСТИКА ISSR-PCR-МАРКЕРОВ *P. sibirica* И *P. sylvestris*

ISSR-праймер	Последовательность (5'→3')	Длина фрагментов, п.н.	Общее число полиморфных ISSR-PCR маркеров (их частота)	
			N	P
<i>P. sibirica</i>				
ISSR-9	(ACG) <sub>7</sub> G	200-1030	21	19 (0,905)
X11	(AGC) <sub>6</sub> G	230-1220	25	22 (0,880)
M1	(AC) <sub>8</sub> CG	190-1320	17	12 (0,706)
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	200-970	19	16 (0,842)
CR-217	(GT) <sub>6</sub> GG	250-1570	20	19 (0,950)
	Всего		102	88 (0,863)
<i>P. sylvestris</i>				
ISSR-1	(AC) <sub>8</sub> T	220-930	20	17 (0,850)
CR-212	(CT) <sub>8</sub> TG	270-1400	27	26 (0,963)
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	220-1000	25	24 (0,960)
M27	(GA) <sub>8</sub> C	240-1000	20	15 (0,750)
X10	(AGC) <sub>6</sub> C	210-1100	21	18 (0,857)
	Всего		113	100 (0,885)

Примечание: N — общее число ISSR-PCR-маркеров, P — число полиморфных ISSR-маркеров, в скобках дана их частота.

Однако, эффективное число аллелей ( $n_e$ ) значительно (Таблица 3) выше у *P. sibirica* ( $n_e = 1,335$ ) по сравнению с *P. sylvestris* ( $n_e = 1,268$ ).

Таблица 3.

СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ДВУХ ВИДОВ РОДА *PINUS*

Выборка	$P_{95}$	$H_E$	$n_e$	$n_a$
Популяции <i>P. sibirica</i>	0,863	0,195 (0,011)	1,335 (0,021)	1,330 (0,048)
Популяции <i>P. sylvestris</i>	0,885	0,166 (0,010)	1,268 (0,018)	1,212 (0,051)
Критерий	Фишера (F)		Критерий Стьюдента (t)	
Значение критерия	F=0,419	F=0,477	t=2,420	t=1,680
Сравнение с $F_{st}$ или $t_{st}$	0,419 < 1,960	0,477 < 1,960	2,420 > 1,977	1,680 < 1,977

Примечание:  $P_{95}$  — доля полиморфных локусов,  $H_E$  — ожидаемая гетерозиготность;  $n_e$  — эффективное число аллелей на локус; у  $H_E$  и  $n_e$  в скобках даны стандартные отклонения.

Число редких аллелей выше у *P. sylvestris* ( $R=29$ ) по сравнению с *P. sibirica* ( $R=18$ ). Анализ генетической структуры трех популяций *P. sibirica* показал (Таблица 4), что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на общую выборку ( $H_T$ ) составила 0,287. Этот показатель выше, чем ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции ( $H_S=0,196$ ). Наибольшая дифференциация популяций сосны сибирской установлена с использованием праймера X-11 [(AGC)<sub>6</sub>G]. Установлено, что доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или коэффициент подразделенности ( $G_{ST}$ ) составил 0,320.

У *P. sylvestris* доля гетерозиготных генотипов на общую выборку ( $H_T$ ) составила 0,238, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции ( $H_S=0,196$ ). Наибольшая дифференциация популяций сосны обыкновенной выявлена с использованием праймера CR-215 [(CA)<sub>6</sub>GT]. Коэффициент подразделенности ( $G_{ST}$ ) у *P. sylvestris* равен 0,303 (Таблица 4).

Таблица 4.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ  
 ИЗУЧЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ДВУХ ВИДОВ РОДА *PINUS*

ISSR- PCR праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
<i>P. sibirica</i>				
CR-217	(GT) <sub>6</sub> GG	0,312 (0,017)	0,227 (0,013)	0,272
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	0,260 (0,028)	0,192 (0,020)	0,264
ISSR-9	(ACG) <sub>7</sub> G	0,260 (0,028)	0,192 (0,020)	0,264
M-1	(AC) <sub>8</sub> CG	0,303 (0,031)	0,231 (0,022)	0,239
X-11	(AGC) <sub>6</sub> G	0,274 (0,030)	0,167 (0,017)	0,390
<i>Среднее</i>		<i>0,287 (0,027)</i>	<i>0,196 (0,018)</i>	<i>0,320</i>
<i>P. sylvestris</i>				
ISSR-1	(AC) <sub>8</sub> T	0,281 (0,028)	0,171 (0,010)	0,391
CR-212	(CT) <sub>8</sub> TG	0,261 (0,020)	0,211 (0,015)	0,190
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	0,251 (0,027)	0,156 (0,009)	0,379
M27	(GA) <sub>8</sub> C	0,177(0,022)	0,133 (0,010)	0,248
X10	(AGC) <sub>6</sub> C	0,209(0,021)	0,145 (0,007)	0,307
<i>Среднее</i>		<i>0,238(0,024)</i>	<i>0,166 (0,011)</i>	<i>0,303</i>

Примечание:  $H_T$  — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов как мера общего генного разнообразия во всей популяции;  $H_S$  — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции, как мера ее внутривидового разнообразия или среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам;  $G_{ST}$  — доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения.

Установлено, что доля межпопуляционного генетического разнообразия ( $G_{ST}$ ) близка у обоих исследованных видов рода *Pinus*. При этом значение данного показателя ( $G_{ST} = 0,320$ ) у *P. sibirica* незначительно выше, чем у *P. sylvestris* ( $G_{ST} = 0,303$ ). В целом, можно сказать, что популяции исследованных видов рода *Pinus* дифференцированы в средней степени, поскольку на межпопуляционную компоненту у *P. sibirica* приходится около 32,0% всей генетической изменчивости, а у *P. sylvestris* – 30,3%.

При подсчете попарных генетических расстояний было установлено, что у *P. sibirica* на наименьшем генетическом расстоянии ( $D=0,157$ ) находятся популяции *Ps\_Kr* и *Ps\_Bs*, а на наибольшем ( $D=0,213$ ) популяции *Ps\_Kh* и *Ps\_Bs*. У *P. sylvestris* наиболее генетически удаленными являются популяции *Psl\_Ks* и *Psl\_Br* ( $D=0,187$ ), а на наименьшем генетическом расстоянии расположены популяции *Psl\_Br* и *Psl\_Zc* ( $D=0,042$ ).

На основании матриц попарных генетических расстояний ( $D$ ) был проведен кластерный анализ невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) и построены дендрограммы, отражающие степень сходства по ISSR-спектрам исследуемых популяций каждого вида. На дендрограмме популяции *P. sibirica Ps\_Kr* и *Ps\_Bs* сформировали 1 кластер, к ним примыкает популяция *Ps\_Kh* (Рисунок 1А).

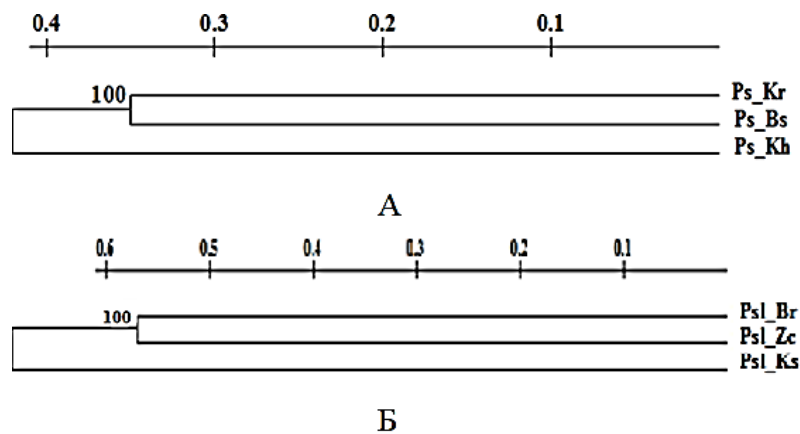


Рисунок 1. UPGMA-дендрограмма генетического сходства исследуемых популяций *P. sibirica* (А) и популяций *P. sylvestris* (Б); шкала сверху — генетическое расстояние; на дендрограмме цифрами указаны значения бутстрепа (в %)

На дендрограмме *P. sylvestris* 1 кластер сформировали выборки *Psl\_Zc* и *Psl\_Br*, а к ним примыкает популяция *Psl\_Ks* (рис. 1Б). О достоверности межкластерных различий можно судить по высокому индексу бутстрепа (>50%) в узлах ветвления.

При выявлении зависимости между генетическими и географическими расстояниями с помощью теста Мантелы у *P. sibirica* был получен высокий коэффициент детерминации ( $R^2 = 0,6871$ ), что свидетельствует о высокой корреляции между географическим и генетическим расстояниями у популяций у *P. sibirica* (Рисунок 2А).

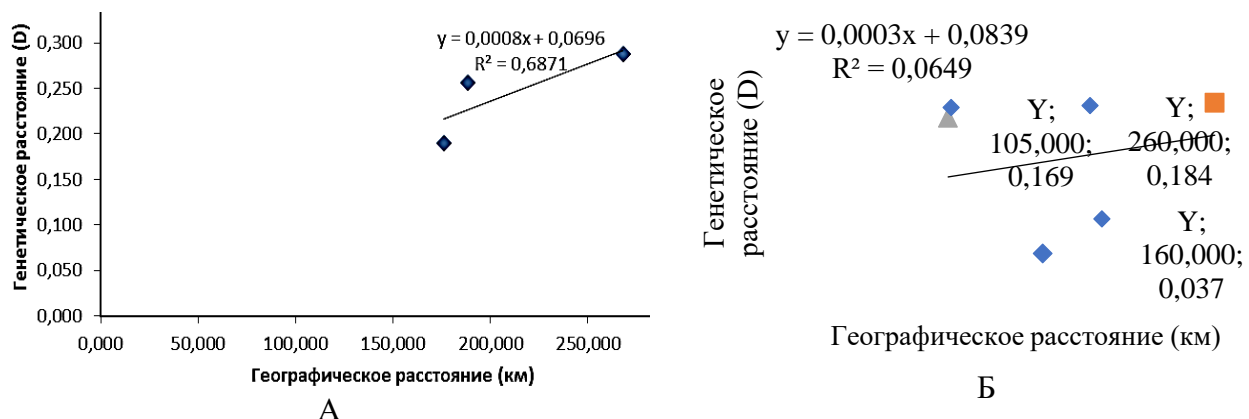


Рисунок 2. График зависимости генетических и географических расстояний у изученных популяций: А — *P. sibirica*; Б — *P. sylvestris*

У *P. sylvestris* с использованием теста Мантелы был выявлен низкий коэффициент детерминации ( $R^2 = 0,0649$ ), что указывает на низкую степень корреляции между географическим и генетическим расстояниями популяций этого вида (Рисунок 2Б).

### Заключение

При молекулярно-генетическом анализе у *P. sylvestris* выявлено 113 ISSR-PCR маркеров, а у *P. sibirica* меньше — 102 ISSR-PCR маркера. Доля полиморфных локусов незначительно выше у *P. sylvestris* ( $P_{95}=0,885$ ) по сравнению с этим показателем у *P. sibirica* ( $P_{95}=0,863$ ). Другие показатели генетического разнообразия незначительно выше у *P. sibirica* ( $H_E=0,195$ ;  $n_a=1,330$ ) в сравнении с *P. sylvestris* ( $H_E=0,166$ ;  $n_a=1,212$ ). Интересен тот факт, что достоверно отличается у двух изученных видов только один показатель генетического

разнообразия, а именно — число эффективных аллелей:  $n_e=1,335$  у *P. sibirica* и  $n_e=1,268$  у *P. sylvestris*. Вместе с тем наибольшее число редких аллелей отмечено у *P. sylvestris* ( $R=29$ ). Наибольшим генетическим разнообразием характеризуются популяция *Ps\_Kh* у *P. sibirica* ( $H_E=0,247$ ;  $n_a=1,578$ ;  $n_e=1,427$ ) и популяция *Psl\_Br* у *P. sylvestris* ( $H_E=0,227$ ;  $n_a=1,558$ ;  $n_e=1,375$ ), которые рекомендуются для сохранения генетического разнообразия изученных видов на популяционном уровне. Анализ генетической структуры показал, что коэффициенты генетической подразделенности ( $G_{ST}$ ) у двух изученных видов рода *Pinus* близки и составляют 0,320 у *P. sibirica* и 0,303 у *P. sylvestris*. В связи с этим, популяции сосны сибирской и сосны обыкновенной характеризуются средней степенью генетической дифференциации. На наибольшем генетическом расстоянии находятся популяции *Ps\_Kh* и *Ps\_Bs* у *P. sibirica* и популяции *Psl\_Ks* и *Psl\_Br* у *P. sylvestris*, а на наименьшем — популяции *Ps\_Kr* и *Ps\_Bs* *P. sibirica* и популяции *Psl\_Br* и *Psl\_Zc* у *P. sylvestris*. Полученные результаты подтверждаются на UPGMA-дендрограммах генетического сходства. С использованием теста Мантела установлено, что между генетическими и географическими расстояниями у популяций *P. sibirica* степень корреляции высокая ( $R^2 = 0,6871$ ), а у популяций *P. sylvestris* — низкая ( $R^2 = 0,0649$ ). Результаты данного исследования важны для разработки рекомендаций по сохранению генофондов двух видов рода *Pinus* в Пермском крае.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/174.3 от 31.01.2019.*

#### Список литературы:

1. Видякин А. И., Кантор Г. Я. Пространственная организация и факторы формирования групп популяций сосны обыкновенной в Южном Зауралье // Вестник Оренбургского государственного университета. 2013. Т. 159. №10. С. 34-39.
2. Yanbaev Y., Sultanova R., Blonskaya L., Bakhtina S., Tagirova A., Tagirov V., Kulagin A. Gene pool of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Under reforestation in extreme environment // Wood Research. 2020. V. 65. №3. P. 459-470. <https://doi.org/10.37763/wr.1336-4561/65.3.459470>
3. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant molecular biology. 1985. V. 5. №2. P. 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
4. Нечаева Ю. С., Бельтюкова Н. Н., Пришневская Я. В., Тайман К. Е. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края // Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование: Материалы междунар. конф. Пермь, 2011. С. 278-282.
5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. №2. P. 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
6. Мазунина Ж. И., Нечаева Ю. С. Анализ эффективности ISSR-праймеров для изучения полиморфизма ДНК кедра сибирского *Pinus sibirica* Du Tour // Научные исследования: теоретико-методологические подходы и практические результаты: материалы Международной научно-практической конференции. Самара, 2017. С. 376-378.
7. Бобошина И. В., Нечаева Ю. С., Видякин А. И., Боронникова С. В. Подбор праймеров для проведения ISSR-анализа полиморфизма ДНК *Pinus sylvestris* L. // Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии: материалы научной конференции. Ростов-на-Дону, 2013. С. 17-20.



8. Yeh F. C., Yang R. C., Mao J., Ye Z., Boyle T. J. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Dept. Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Canada. 1996. V. 238.
9. Peakall R. O. D., Smouse P. E. GenALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular ecology notes. 2006. V. 6. №1. P. 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
10. Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic acids research. 1990. V. 18. №22. P. 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
11. Kimura M., Crow J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics. 1964. V. 49. №4. P. 725. <https://doi.org/10.1093/genetics/49.4.725>
12. Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia university press, 1987.
13. Nei M. Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publishing Company, 1975.
14. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979. V. 76. №10. P. 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
15. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer research. 1967. V. 27. №2. Part 1. P. 209-220.

#### References:

1. Vidyakin, A. I., & Kantor, G. Ya. (2013). Prostranstvennaya organizatsiya i faktory formirovaniya grupp populyatsii sosny obyknovennoi v Yuzhnom Zaural'e. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 159(10), 34-39. (in Russian).
2. Yanbaev, Y., Sultanova, R., Blonskaya, L., Bakhtina, S., Tagirova, A., Tagirov, V., & Kulagin, A. (2020). Gene pool of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Under reforestation in extreme environment. *Wood Research*, 65(3), 459-470. <https://doi.org/10.37763/wr.1336-4561/65.3.459470>
3. Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*, 5(2), 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
4. Nechaeva, Yu. S., Beltyukova, N. N., Prishnivskaya, Ya. V., & Taiman, K. E. (2011). Optimizatsiya metodiki vydeleniya DNK nekotorykh khvoinykh vidov rastenii Permskogo kraja. Sintez znaniy v estestvennykh naukakh. *Rudnik budushchego: proekty, tekhnologii, oborudovanie: Materialy mezhdunar. konf. Perm*, 278-282. (in Russian).
5. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
6. Mazunina, Zh. I., & Nechaeva, Yu. S. (2017). Analiz effektivnosti ISSR-praimerov dlya izucheniya polimorfizma DNK kedra sibirskogo *Pinus sibirica* Du Tour. *Nauchnye issledovaniya: teoretiko-metodologicheskie podkhody i prakticheskie rezul'taty: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Samara*, 376-378. (in Russian).
7. Boboshina, I. V., Nechaeva, Yu. S., Vidyakin, A. I., & Boronnikova, S. V. (2013). Podbor praimerov dlya provedeniya ISSR-analiza polimorfizma DNK *Pinus sylvestris* L. *Molekulyarno-geneticheskie podkhody v taksonomii i ekologii: materialy nauchnoi konferentsii. Rostov-on-Don*, 17-20. (in Russian).

8. Yeh, F. C., Yang, R. C., Mao, J., Ye, Z., & Boyle, T. J. (1996). POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Dept. Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Canada*, 238.
9. Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
10. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
11. Kimura, M., & Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725. <https://doi.org/10.1093/genetics/49.4.725>
12. Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.
13. Nei, M. (1975). *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland Publishing Company.
14. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
15. Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.

Работа поступила  
в редакцию 09.03.2021 г.

Принята к публикации  
13.03.2021 г.

Ссылка для цитирования:

Нечаева Ю. И., Пыстогова Н. А., Чертов Н. В., Боронникова С. В. Молекулярно-генетический анализ популяций *Pinus sylvestris* L. и *Pinus sibirica* Du Tour в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-PCR маркеров // Бюллетень науки и практики. 2021. Т. 7. №4. С. 12-21. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/65/01>

Cite as (APA):

Nechaeva, Yu., Pystogova, N., Chertov, N., & Boronnikova, S. (2021). Molecular Genetic Analysis of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus sibirica* Du Tour Populations in Perm Krai Based on Polymorphism ISSR-PCR markers. *Bulletin of Science and Practice*, 7(4), 12-21. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/65/01>