

УДК 575.17: 582.475(470.22)

СОСТОЯНИЕ ГЕНОФОНДА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ *Pinus sylvestris* L. В КАРЕЛИИ

А. А. Ильинов, Б. В. Раевский

Институт леса Карельского научного центра РАН
185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: ialexa33@yandex.ru, borisraevsky@gmail.com

Поступила в редакцию 29.10.2015 г.

С целью изучения особенностей внутривидового разнообразия сосны обыкновенной в Карелии с помощью четырех ядерных микросателлитных локусов (Spac11.8, Spac12.5, PtTX2123, PtTX2146) проведен анализ генетической структуры трех естественных популяций *Pinus s. ssp. lapponica* (Алакуртти, Гридино, Пяозеро) и шести естественных популяций *P. s. ssp. sylvestris* (Войница, Маслозеро, Водлозеро, Заонежье, Кивач, Сортавала). Всего обнаружено 65 аллелей. Все четыре исследованных локуса оказались полиморфны во всех популяциях. Уровень наблюдаемой гетерозиготности был ниже ожидаемого, что свидетельствует о дефиците гетерозигот в популяциях сосны в Карелии. По сравнению с данными, полученными ранее с помощью анализа изоферментов, карельские популяции сосны обыкновенной характеризуются высокими показателями генетического разнообразия. Не выявлено значительных различий в генетической структуре и уровне разнообразия у популяций, представленных *ssp. lapponica*, с остальными карельскими популяциями сосны обыкновенной. Результаты AMOVA-анализа указывают на относительно невысокий уровень межпопуляционной дифференциации сосны обыкновенной в регионе – 91 % выявленной изменчивости приходится на внутривидовую составляющую. Кластерный анализ на основе матрицы расстояний с помощью метода UPGMA позволил выявить популяционную структуру *P. sylvestris*. Все карельские популяции разделились на два кластера, расстояние между которыми оказалось значительным ($D_N = 0.239$). В первый вошло большинство популяций сосны из всех лесосеменных районов Карелии и мурманская популяция ($D_N = 0.037–0.117$). Во вторую группу вошли генетически значительно обособленные ($D_N = 0.140$) южно-карельские Заонежье и Кивач, характеризовавшиеся низким уровнем разнообразия.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, естественные популяции, генетическая структура, ПЦР, микросателлиты, генетическое разнообразие.

DOI: 10.15372/SJFS20160504

ВВЕДЕНИЕ

Сосна обыкновенная в силу уникального сочетания ее свойств считается самой ценной древесной породой. На протяжении столетий она интенсивно эксплуатировалась на Европейском Севере России, что привело к концу прошлого века к сильной трансформации и фрагментации коренных сосновых лесов в регионе. В то же время сосна является главным объектом искусственного лесовосстановления, доминируя в структуре объектов единого генетико-селекционного комплекса (ЕГСК).

Фенотипическое разнообразие сосны обыкновенной в Карелии и на Кольском полуострове изучал Г. М. Козубов (1962), который выявил несколько форм сосны обыкновенной, в частности, описал подвид сосны лапландская *Pinus sylvestris ssp. lapponica* Fr., произрастающий на территории Карелии ориентировочно севернее 65° с. ш. Позднее в регионе продолжили изучение внутривидовой изменчивости сосны А. А. Ильинов и Б. В. Раевский (2003), выделившие на основании анализа морфологических признаков с помощью многомерной статистики (вычисление обобщенного расстояния Маха-

ланобиса, кластерный, факторный и дискриминантный анализы) 6 популяций, произрастающих на территории республики и смежных областей.

Ю. А. Янбаев и др. (1998) с помощью изоферментного анализа изучили генетическую структуру и разнообразие популяций сосны обыкновенной. Выявленные различия касались в основном представленности редких аллелей. Отмечена генетическая обособленность северных насаждений, однако не обнаружено оснований для выделения подвида сосны лапландской. Необходимо отметить, что выявить особенности популяционной структуры сосны обыкновенной в Карелии оказалось непросто, поскольку зачастую материал для анализа собирали в древостоях, в прошлом подвергшихся усиленной эксплуатации, а это могло оказать влияние на естественную структуру популяций вида в регионе. Очевидна необходимость более детальных исследований в малонарушенных популяциях, которые могли бы служить эталоном для изучения внутривидового разнообразия и популяционной структуры сосны обыкновенной.

Лесосеменное районирование и результаты исследований объектов ЕГСК плохо согласуются с имеющейся информацией о популяционно-генетической структуре вида в регионе. Необходимы дополнительные исследования, призванные обеспечить теоретическую базу селекции и семеноводства *P. sylvestris*, сохранения и использования ее генетических ресурсов в регионе.

В последние десятилетия при изучении популяций нашли широкое применение молекулярно-генетические маркеры – микросателлиты – варьирующие участки (локусы) в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрий и пластид), состоящие из tandemно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей. Эти маркеры характеризуются высоким уровнем полиморфизма и часто встречаются в геноме. Благодаря своим свойствам они могут быть крайне полезны при изучении популяционной структуры хвойных древесных видов, отличающихся невысоким уровнем межпопуляционного разнообразия. В настоящее время микросателлитные праймеры, разработанные для большого числа хвойных видов древесных растений, активно используются в популяционно-генетических исследованиях (Vendramin et al., 1996; Devey et al., 1996; Pfeiffer et al., 1997; Elsik et al., 2000; Scotti et al., 2002; Aizawa et al., 2009; Salzer et al., 2009;

Орешкова и др., 2014), в том числе и для сосны обыкновенной (Soranzo et al., 1998; Robledo-Arnuncio et al., 2005; Nowakowska et al., 2014).

Цель настоящей работы – изучение с помощью ядерных микросателлитных локусов особенностей генетической структуры и оценка уровня генетического разнообразия популяций сосны обыкновенной в Карелии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали естественные популяции сосны обыкновенной Гридино, Пяозеро, Войница, Маслозеро, Водлозеро, Заонежье, Кивач и Сортавала (рис. 1).

В естественных сосняках северной и средней подзон тайги Карелии в Карельском и Южно-Карельском лесосеменных районах (Лесосеменное районирование..., 1982) в основном в пре-



Рис. 1. Карта-схема расположения пунктов сбора материала по сосне обыкновенной: 1 – Алакургти; 2 – Гридино; 3 – Пяозеро; 4 – Войница; 5 – Маслозеро; 6 – Водлозеро; 7 – Кивач; 8 – Заонежье; 9 – Сортавала.

Таблица 1. Характеристика карельских малонарушенных популяций сосны обыкновенной

№ п/п	Популяция Обозначение	Расположение популяций	Географические координаты (град. с. ш./ в. д.)	Возраст древостоя, лет
1	<u>Алакуртти</u> АЛА	Мурманская обл., Кандалакшский район	<u>66.95278</u> <u>29.61083</u>	80
2	<u>Гридино</u> ГРИ	Планируемый заказник «Гридино», Лоухский район	<u>65.96686</u> <u>34.65734</u>	180
3	<u>Пяозеро</u> ПЯО	Национальный парк «Паанаярви», Лоухский район	<u>65.94450</u> <u>31.08857</u>	140
4	<u>Войница</u> ВОЙ	Заказник «Войница», Калевальский район	<u>65.15505</u> <u>30.19625</u>	120
5	<u>Маслозеро</u> МАС	Планируемый заказник «Маслозеро», Муезерский район	<u>63.52453</u> <u>32.78677</u>	200
6	<u>Водлозеро</u> ВОД	Национальный парк «Водлозерский», Пудожский район	<u>62.54231</u> <u>37.02495</u>	180
7	<u>Заонежье</u> ЗАО	Планируемый заказник «Заонежский», Медвежьегорский район	<u>62.23898</u> <u>34.87955</u>	160
8	<u>Кивач</u> КИВ	Заповедник «Кивач», Кондопожский район	<u>62.30690</u> <u>33.97160</u>	160
9	<u>Сортавала</u> СОР	Защитные леса, Сортавальский район	<u>61.66322</u> <u>30.64832</u>	140

делах существующих либо планируемых особо охраняемых природных территорий (ООПТ) были заложены постоянные пробные площади (ППП). Кроме этого, для изучения генетической структуры и особенностей генетического разнообразия малонарушенных популяций сосны дополнительно силами сотрудников лаборатории наземных экосистем Института проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН во главе с заведующей лабораторией Л. Г. Исаевой был собран материал с модельных деревьев сосны обыкновенной с

ППП, расположенной западнее пос. Алакуртти (Мурманская обл.), вблизи границы с Финляндией. ППП закладывали в соответствии с ОСТ 56-69-83 (1993). Характеристика популяций приведена в табл. 1.

Выделение образцов геномной ДНК сосны осуществлялось с помощью набора Axuyprep Multisource Genomic DNA (Axuypgen). Для анализа популяций сосны обыкновенной из семи протестированных ядерных микросателлитных локусов (Elsik et al., 2000; Soranzo et al., 1998) отобрали четыре (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика микросателлитных праймеров, использованных для анализа популяций сосны обыкновенной

№ п/п	Локус	Последовательность праймеров 5–3'	Мотив	Число аллелей	Размер фрагмента, п.н.о.	t, °C
1	Spac11.8	F AGGGAGATCAATAGATCATGG* R CAGCCAAGACATCAAAAATG	(TG) ₁₆	13	130–154	55
2	Spac12.5	F CTTCTTCACTAGTTTCTTTGG R TTGGTTATAGGCATAGATTGC	(GT) ₂₀ (GA) ₁₀	32	127–199	54
3	PfTX2123	F GAAGAACCACAAACACAAG R GGGCAAGAATTCAATGATAA	(AGC) ₈	3	192–201	57
4	PfTX2146	F CCTGGGGATTGGATTGGGTATTTG R CCTGGGGATTGGATTGGGTATTTG	(GAG) ₅ ... (CAG) ₈ CGG (CAG) ₇ CGG (CAG) ₄	17	168–249	57

Примечание. F, R – прямой и обратный праймеры; прямые праймеры каждого локуса метили флуоресцентной меткой Cy5; п.н.о. – пар нуклеотидных оснований; t – температура отжига.

Основными критериями для отбора микросателлитных локусов служили высокая степень информативности, полиморфности и воспроизводимости амплификации. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали 26 мкл реакционной смеси следующего состава: 50 нг ДНК исследуемых образцов, 100 пМ праймера, 5 мкл набора с Taq ДНК полимеразой (Москва, «СибЭнзим»). Для проведения амплификации применяли прибор iCycler iQ5 (Bio-Rad). Условия амплификации: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 53–62 °С (в зависимости от используемого праймера), полимеризация – 40 с при 72 °С; количество циклов – 35; достраивание фрагментов – 6 мин при 72 °С. Образцы ДНК анализировали методом капиллярного гель-электрофореза (Beckman Coulter CEQ800 Genetic Analysis; программное обеспечение CEQ Fragment Analysis).

Основные показатели генетической изменчивости (среднее число аллелей на локус $A_{99\%}$, среднее число аллелей с частотой > 5 %, $A_{95\%}$, среднее эффективное число аллелей n_e , наблюдаемая H_o и ожидаемая H_e гетерозиготность, ко-

эффициент фиксации Райта F , критерий χ^2 для оценки соответствий наблюдаемых и ожидаемых по правилу Харди–Вайнберга распределений генотипов, анализ молекулярной дисперсии AMOVA (Analysis of Molecular Variance), показатели F -статистики Райта и генетические дистанции по Нею определяли с помощью программы GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006). Построение дендрограммы на основе матрицы генетических расстояний проводили с помощью метода невзвешенного попарного арифметического среднего UPGMA (Sneath, Sokal, 1973).

Для обнаружения и исключения возможных вариантов ошибок генотипирования ядерных микросателлитных локусов использована программа MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генетической структуры карельских популяций сосны обыкновенной показал, что все использованные микросателлитные локусы оказались полиморфны (табл. 3).

Таблица 3. Генетическая структура карельских популяций сосны обыкновенной, выраженная в частотах встречаемости аллелей

Локус	Аллель	Популяция								
		Ала	Гри	Пяо	Вой	Мас	Вод	Зао	Кив	Сор
		Размер выборки								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PtTX2123	192	0.077	0.217	0.250	0.069	0.150	0.130	0.083	0.067	0.200
	195	0.885	0.783	0.750	0.931	0.850	0.870	0.917	0.933	0.783
	201	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
PtTX2146	168	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
	180	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
	183	0.231	0.200	0.233	0.224	0.183	0.152	0.783	0.583	0.183
	186	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000
	195	0.231	0.133	0.183	0.121	0.183	0.196	0.033	0.033	0.150
	201	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	204	0.077	0.100	0.017	0.034	0.000	0.022	0.000	0.000	0.083
	210	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
	213	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.022	0.000	0.000	0.017
	216	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
	219	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
	222	0.269	0.383	0.500	0.500	0.500	0.391	0.133	0.217	0.517
	225	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000
	228	0.115	0.067	0.017	0.086	0.050	0.065	0.033	0.117	0.033
	237	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.087	0.000	0.000	0.000
	243	0.038	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
249	0.038	0.067	0.050	0.000	0.033	0.022	0.000	0.000	0.000	

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Spac11.8	130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
	132	0.000	0.067	0.000	0.103	0.017	0.000	0.033	0.117	0.033
	134	0.077	0.133	0.133	0.017	0.150	0.174	0.083	0.650	0.100
	136	0.346	0.433	0.450	0.362	0.650	0.761	0.400	0.133	0.400
	138	0.423	0.267	0.283	0.207	0.133	0.022	0.000	0.000	0.150
	140	0.038	0.000	0.017	0.052	0.000	0.022	0.050	0.067	0.067
	142	0.000	0.017	0.033	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.083
	144	0.038	0.000	0.017	0.121	0.017	0.000	0.433	0.033	0.017
	146	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	148	0.000	0.017	0.033	0.103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
	150	0.000	0.033	0.033	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	152	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.050
	154	0.077	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.050
Spac12.5	127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
	129	0.000	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000
	131	0.000	0.000	0.033	0.000	0.033	0.022	0.033	0.000	0.017
	133	0.000	0.000	0.033	0.034	0.100	0.000	0.050	0.167	0.133
	135	0.000	0.050	0.017	0.000	0.033	0.022	0.000	0.033	0.050
	137	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000
	141	0.038	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
	143	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.022	0.033	0.000	0.000
	145	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.033
	147	0.038	0.117	0.050	0.034	0.017	0.043	0.300	0.000	0.050
	149	0.192	0.083	0.100	0.034	0.067	0.130	0.050	0.000	0.033
	151	0.000	0.083	0.017	0.052	0.033	0.000	0.033	0.050	0.117
	153	0.000	0.050	0.000	0.069	0.033	0.109	0.000	0.100	0.033
	155	0.000	0.067	0.183	0.121	0.083	0.065	0.033	0.150	0.050
	157	0.038	0.033	0.050	0.086	0.067	0.043	0.167	0.150	0.017
	159	0.192	0.117	0.017	0.155	0.017	0.000	0.017	0.033	0.067
	161	0.038	0.117	0.167	0.017	0.050	0.087	0.033	0.067	0.100
	163	0.000	0.033	0.033	0.052	0.083	0.087	0.017	0.017	0.017
	165	0.115	0.033	0.000	0.052	0.067	0.196	0.050	0.033	0.067
	167	0.000	0.033	0.000	0.017	0.050	0.000	0.017	0.017	0.017
	169	0.115	0.000	0.033	0.052	0.050	0.022	0.017	0.033	0.017
	171	0.038	0.083	0.017	0.069	0.050	0.022	0.000	0.050	0.017
173	0.038	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.067	
175	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
177	0.115	0.067	0.050	0.034	0.050	0.043	0.017	0.017	0.050	
179	0.000	0.000	0.000	0.052	0.033	0.022	0.017	0.000	0.000	
181	0.000	0.033	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	
183	0.000	0.000	0.033	0.017	0.000	0.000	0.033	0.017	0.000	
187	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000	
189	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.022	0.000	0.000	0.000	
199	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.033	0.000	0.000	

Примечание. Обозначение популяций см. табл. 1.

Таблица 4. Уровень генетического разнообразия в популяциях *P. sylvestris*

Популяция	<i>n</i>	Число аллелей на локус $A_{99\%}$	Число аллелей на локус с частотой $\geq 0.05 A_{95\%}$	Эффективное число аллелей на локус n_e	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта F
					наблюдаемая H_o	ожидаемая H_e	
Алакургти	13	7.250	4.250	4.713	0.654	0.666	-0.003
Гридино	30	8.750	5.750	5.765	0.675	0.706	0.019
Пяозеро	30	9.750	4.250	5.732	0.625	0.684	0.082
Войница	29	9.500	5.750	5.928	0.621	0.637	-0.010
Маслозеро	30	10.000	5.000	6.197	0.508	0.604	0.135
Водлозеро	23	9.000	4.250	4.973	0.598	0.645	0.024
Заонежье	30	9.000	4.000	4.281	0.517	0.579	0.055
Кивач	30	8.000	4.500	4.613	0.492	0.583	0.106
Сортавала	30	10.750	6.000	6.127	0.633	0.693	0.061
В среднем		9.111±1.088*	4.917±0.988	5.370±0.768	0.591±0.038	0.644±0.044	0.052±0.024

Примечание. * ± ошибка средней.

Всего выявлено 65 аллелей, из которых более 13 % являются уникальными. Больше всего аллелей выявлено в популяциях Сортавала из Южно-Карельского лесосеменного района и Маслозеро из Центральнокарельского подрайона Северокарельского лесосеменного района (42 и 39 аллеля соответственно).

Минимальным количеством обнаруженных аллелей характеризуется популяция Кивач из Южно-Карельского лесосеменного района (30 аллелей). Небольшое количество аллелей (28) в популяции Алакургти из Мурманской обл. связано, по-видимому, с малым объемом выборки. Популяции Гридино и Пяозеро, представленные *spp. lapponica*, по количеству аллелей не отличались от южно-карельских, за исключением Сортавалы. Не выявлено какой-либо закономерности в изменчивости частот аллелей в направлении север–юг, аллельное разнообразие носит мозаичный характер.

Анализ с использованием критерия χ^2 обнаружил достоверное несоответствие наблюдаемых и ожидаемых по правилу Харди–Вайнберга распределений генотипов по трем локусам – *Srac11.8*, *Srac12.5*, *PtTX2146*. Несовпадение по локусу *Srac11.8* отмечено во всех популяциях, по локусу *Srac12.5* – во всех, за исключением Алакургти, Войницы и Сортавалы, а по локусу *PtTX2146* – только в популяциях Водлозеро и Заонежье. По локусу *PtTX2123* достоверного несоответствия наблюдаемых и ожидаемых по правилу Харди–Вайнберга распределений генотипов не обнаружено.

С помощью программы MICRO-CHECKER выявлены ошибки генотипирования: у микросателлитных локусов *PtTX2146*, *Srac11.8* и

Srac12.5 обнаружены «нуль-аллели». Учет при генотипировании «нуль-аллелей» позволил провести корректировку для получения несмещенной оценки уровня генетического разнообразия и степени подразделенности исследованных популяций сосны обыкновенной (табл. 4).

Анализ генетического разнообразия популяций сосны обыкновенной показал, что все четыре локуса были полиморфны во всех популяциях ($P_{99\%} = 100\%$). Южно-карельская популяция Сортавала, в которой обнаружены максимальные значения показателей аллельного разнообразия, характеризуется и высокими значениями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Южно-карельские популяции Кивач и Заонежье, уступая большинству других в параметрах аллельного разнообразия, отличаются минимальным уровнем как наблюдаемой, так и ожидаемой гетерозиготности. Популяции Алакургти, Гридино и Пяозеро, представленные *spp. lapponica*, по уровню и наблюдаемой, и ожидаемой гетерозиготности превосходят южно-карельские (исключая Сортавалу). Северокарельская Войница, как и южно-карельская Водлозеро, характеризуются, главным образом, промежуточными значениями параметров генетического разнообразия. Единственная популяция, представляющая Центральнокарельский лесосеменной подрайон, Маслозеро, наряду с Сортавалой показавшая максимальный уровень аллельного разнообразия, по уровню гетерозиготности уступает большинству популяций. Таким образом, не выявлено четкой закономерности в распределении генетического разнообразия карельских популяций сосны обыкновенной, хотя и прослеживается отмеченная

Таблица 5. Значения *F*-статистики Райта для карельских популяций сосны обыкновенной

Локус	<i>F</i> -статистики		
	<i>F_{is}</i>	<i>F_{it}</i>	<i>F_{st}</i>
PtTX2123	-0.018	0.018	0.035
PtTX2146	-0.019	0.067	0.084
Spac11.8	0.044	0.127	0.087
Spac12.5	0.214	0.242	0.036
В среднем	0.055 ± 0.055	0.114 ± 0.048	0.060 ± 0.014

ранее Ю. А. Янбаевым с соавт. (1998) слабая тенденция к увеличению наблюдаемой гетерозиготности в направлении от северотаежных популяций к южно-таежным.

В целом исследованные популяции сосны обыкновенной характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия по микросателлитным локусам, особенно по сравнению с данными, полученными ранее (Янбаев и др., 1998) с помощью анализа изоферментов ($A = 2.1-2.8$; $H_o = 0.155-0.241$; $H_e = 0.215-0.284$; $P_{99\%} = 66.7-100.0\%$).

Уровень наблюдаемой гетерозиготности во всех изученных популяциях сосны обыкновенной оказался ниже ожидаемого. Для большинства популяций индекс фиксации Райта *F* оказался положительным, что свидетельствует о дефиците гетерозигот.

О недостатке гетерозигот в карельских популяциях сосны свидетельствуют и показатели *F*-статистики Райта (табл. 5).

Анализ подразделенности обнаружил, что каждое дерево сосны в среднем характеризуется 6%-м дефицитом гетерозигот относительно популяции ($F_{is} = 0.055$) и 11%-м дефицитом ($F_{it} = 0.114$) – относительно вида. Основной вклад в избыток гомозигот вносят локусы

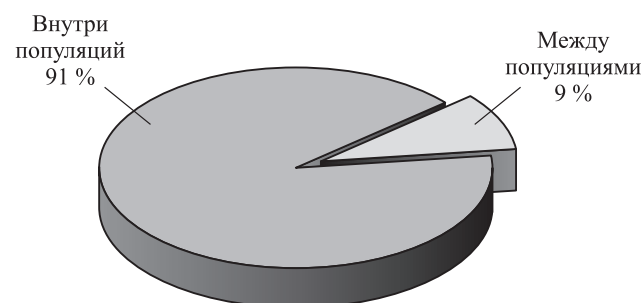


Рис. 2. Соотношение различных уровней внутривидового генетического разнообразия сосны обыкновенной.

Spac11.8 и Spac12.5. Явление дефицита гетерозигот обнаружено также при изучении аллозимной изменчивости популяций сосны обыкновенной из других частей ареала (Шигапова, Шигапов, 2009) при исследовании генетической дифференциации елей сибирской, европейской и финской (Потокина и др., 2012). Вероятно, причиной избыточной гомозиготности является эффект Валунда (Wahlund, 1928), когда подразделенные популяции характеризуются неоднородностью в смысле частот аллелей. Тогда доля гомозигот в таких популяциях будет больше, чем предсказывается соотношением Харди–Вайнберга.

Значения *F_{st}* варьировали от 0.035 для PtTX2123 до 0.087 для Spac11.8, составляя в среднем 0.060, что указывает на относительно невысокий уровень межпопуляционной дифференциации популяций сосны обыкновенной в регионе.

Результат AMOVA-анализа показал, что большая часть общей генетической дисперсии, обнаруженной на основе исследования микросателлитных локусов, приходится на изменчивость внутри популяций, межпопуляционная доля составляет 9% (рис. 2).

Для количественной оценки уровня межпопуляционной генетической дифференциации карельских популяций сосны обыкновенной были произведены вычисления генетических дистанций М. Неи (Nei, 1972). Более наглядно результаты этих вычислений можно представить в виде дендрограммы сходства, построенной на основе матрицы расстояний с помощью метода UPGMA (рис. 3).

В первую группу объединились практически все карельские популяции сосны обыкновенной ($D_N = 0.117$). Наиболее генетически близки между собой оказались северокарельские популяции

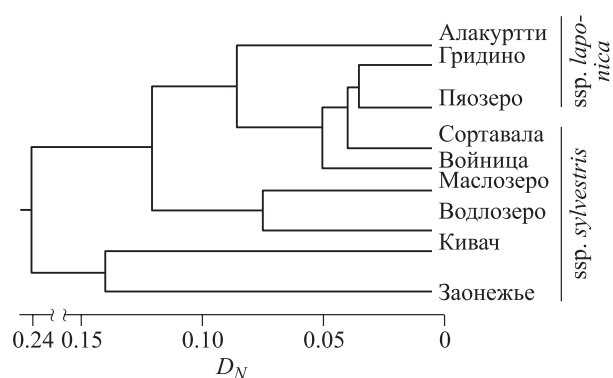


Рис. 3. Дендрограмма сходства карельских популяций сосны обыкновенной по генетическому расстоянию Неи (D_N).

Гридино, Пяозеро и Войница ($D_N = 0.037-0.049$). В один кластер с северокарельскими популяциями вошли самая южная популяция Сортавала (0.043) и более генетически обособленная мурманская Алакуртти ($D_N = 0.085$). В отдельный кластер вошли центральнокарельская популяция Маслозеро и южно-карельская Водлозеро ($D_N = 0.074$).

Вторую, меньшую, группу составили южнокарельские популяции Кивач и Заонежье, характеризующиеся низким уровнем генетического разнообразия. Эта группа популяций отличается высоким уровнем генетической обособленности ($D_N = 0.140$), а также удаленностью от основной группы популяций ($D_N = 0.239$). Обособленность мурманской популяции скорее связана не с ее принадлежностью к *ssp. lapponica*, а с небольшим объемом выборки. На это указывает близкое генетическое соседство двух других популяций Гридино и Пяозеро с южно- и центральнокарельскими популяциями сосны обыкновенной.

В целом выявленная с помощью ядерных микросателлитных локусов популяционная структура сосны обыкновенной в Карелии свидетельствует о генетической близости большинства исследованных популяций и высокой степени однородности генофонда сосны обыкновенной в регионе. Обособленность популяций Заонежье и Кивач может отражать отличия в уровне генетического разнообразия этих популяций и связана с особенностями расселения сосны вблизи Онежского озера в послеледниковый период. Не обнаружено корреляции генетических дистанций с географическими расстояниями между карельскими популяциями сосны обыкновенной. Настоящее исследование подтверждает отмеченное ранее (Ильинов, Раевский, 2003) несоответствие существующего лесосеменного районирования популяционной структуре сосны обыкновенной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ генетической структуры карельских популяций сосны обыкновенной обнаружил, что все использованные микросателлитные локусы оказались полиморфны. Всего выявлено 65 аллелей. Северокарельские популяции, представленные *ssp. lapponica*, по уровню аллельного разнообразия не отличались от южно-карельских. В то же время эти популяции по уровню наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности превосходят южно-карельские. Популя-

ции Кивач и Заонежье характеризуются низким уровнем генетического разнообразия. В целом карельские популяции *P. sylvestris* показали довольно высокий уровень генетического разнообразия по микросателлитным локусам, особенно по сравнению с данными, полученными ранее с помощью анализа изоферментов.

Во всех исследованных популяциях обнаружен дефицит гетерозигот. Это подтверждают положительные значения *F*-статистик Райта. Среднее значение *Fst* указывает на незначительный уровень межпопуляционной дифференциации.

AMOVA-анализ показал, что большая часть общей генетической дисперсии, обнаруженной на основе исследования микросателлитных локусов, приходится на изменчивость внутри популяций, межпопуляционная доля составляет 9 %.

Результаты вычислений генетических дистанций по Неи показали обособленность южно-карельских популяций Кивач и Заонежье. Однако в целом выявленная с помощью микросателлитных локусов популяционная структура сосны обыкновенной в Карелии свидетельствует о генетической близости большинства исследованных популяций и высокой степени однородности генофонда *P. sylvestris* в регионе. Настоящим исследованием не выявлено оснований для выделения сосны лапландской в самостоятельный подвид.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией наземных экосистем Института проблем промышленной экологии Севера Кольского НЦ РАН Л. Г. Исаевой за предоставленный экспериментальный материал.

Работа выполнена по проекту № 0220-2015-0015 программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие природных систем» (подпрограмма «Генофонды живой природы и их сохранение»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильинов А. А., Раевский Б. В. Внутривидовое разнообразие сосны и ели // Разнообразие биоты Карелии: условия формирования, сообщества, виды. Петрозаводск, 2003. С. 91–98.
- Козубов Г. М. Внутривидовое разнообразие сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии и на Кольском полуострове: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1962. 20 с.
- Лесосеменное районирование основных лесообразующих пород в СССР. М.: Лесн. пром-сть, 1982. 368 с.

- Орешкова Н. В., Седельникова Т. С., Пименов А. В., Ефремов С. П. Генетическая структура и дифференциация болотных и суходольных популяций сосны кедровой сибирской *Pinus sibirica* Du Tour по ядерным микросателлитным локусам // Генетика. 2014. Т. 50. № 9. С. 1059–1067.
- ОСТ 56-69-83. Площади пробные лесоустроительные. Методы закладки. Порядок рассмотрения и утверждения возрастов рубок главного пользования лесом. Приказ Рослесхоза от 28.05.1993. № 134.
- Потокина Е. К., Орлова Л. В., Вишневецкая М. С., Алексеева Е. А., Потокин А. Ф., Егоров А. А. Генетическая дифференциация популяций ели на северо-западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов // Экол. генетика. 2012. Т. 10. № 2. С. 40–49.
- Шуганова А. И., Шуганов З. Х. Генетическое разнообразие популяций сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. // Вестн. Оренбургск. гос. ун-та. 2009. Вып. 6. С. 445–447.
- Янбаев Ю. А., Тренин В. В., Шуганов З. Х., Чистяков Б. А., Бахтиярова Р. М. Генетическая изменчивость и дифференциация сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. на территории Карелии // Научные основы селекции древесных растений Севера. Петрозаводск: Карельск. науч. центр РАН, 1998. С. 25–32.
- Aizawa M., Yoshimaru H., Saito H., Katsuki T., Kawahara T., Kitamura K., Shi F., Sabirov R., Kaji M. Range-wide genetic structure in a north-east Asian spruce *Picea jezoensis* determined using nuclear microsatellite markers // J. Biogeogr. 2009. V. 36. I. 5. P. 996–1007.
- Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N., Neale D. B., Moran G. F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 673–679.
- Elsik C. G., Minihan V. T., Hall S. E., Scarpa A. M., Williams C. G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. // Genome. 2000. V. 43. P. 550–555.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. V. 106. P. 283–292.
- Nowakowska J. A., Zachara T., Konecka A. Genetic variability of Scots pine *Pinus sylvestris* L. and Norway spruce *Picea abies* L. Karst. natural regeneration compared with their maternal stands // For. Res. Papers. 2014. V. 75. I. 1. P. 47–54.
- Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecol. Notes. 2006. N. 6. P. 288–295.
- Pfeiffer A., Oliveri A. M., Morgante M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst // Genome. 1997. V. 40. P. 411–419.
- Robledo-Arnuncio J. J., Collada C., Alia R., Gil L. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area // J. Biogeogr. 2005. N. 32. P. 595–605.
- Salzer K. L., Sebastiani F., Gugerli F., Buonamici A., Vendramin G. G. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. // Molecular Ecol. Resources. 2009. N. 9. P. 858–861.
- Scotti I., Magni F., Paglia G. P., Morgante M. Trinucleotide microsatellite in Norway spruce *Picea abies*: their features and the development of molecular markers // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 106. P. 40–50.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1973. 549 p.
- Scoranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. // Molecular Ecol. 1998. V. 7. P. 1260–1261.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W., Wills D., Shipley P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecol. Resources. 2004. N. 4. P. 535–538.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae // Molecular Ecol. 1996. N. 5. P. 595–598.
- Wahlund S. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus Betrachtet // Hereditas. 1928. V. 11. P. 65–106.

THE CURRENT STATE OF *Pinus sylvestris* L. GENE POOL IN KARELIA

A. A. Ilyinov, B. V. Raevsky

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
Pushkin str., 11, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185960 Russian Federation

E-mail: ialex33@yandex.ru, borisraevsky@gmail.com

Three native populations of *P. sylvestris*, ssp. *lapponica* (Alakurtti, Gridino, Pjaozero) and six native populations of *P. s.*, ssp. *sylvestris* (Voinitsa, Maslozero, Vodlozero, Zaonezshye, Kivach, Sortavala) along with one artificial population – Petrozavodsk seed orchard have been studied using four nuclear microsatellite primers (Spac11.8, Spac12.5, PtTX2123, PtTX2146) to find out the peculiarities of Scotch pine intraspecific diversity in Karelia. In total, 66 alleles were found. All four loci turned out to be polymorphic in all populations. The observed heterozygosity level of all studied Karelian populations was lower than expected, which is evidence of heterozygotes deficiency in Karelian pine populations. Overall, the investigated *P. sylvestris* populations can be described as having a high level of the genetic variability especially compared to results obtained earlier by isozyme analyses. The Petrozavodsk seed orchard ought to be mentioned as having one of the highest levels of the genetic variability, which gives evidences in favor of good state regarding representativeness of Scotch pine gene pool here. No substantial differences in genetic structure and diversity levels have been found for ss. *lapponica* populations vs. ss. *sylvestris* ones. AMOVA analysis showed that despite the significant differences between pine populations, considering both the allele composition and the genetic diversity, the major part of the variety (90 %) was allocated inside group. The investigated populations were subdivided into two clusters using UPGMA technique characterized by substantial Nei distance ($D_N = 0.273$). The former one included the majority of Karelian pine populations ($D_N = 0.030–0.082$) along with the Alakurtti population from Murmansk region. The latter cluster consisted of the most isolated «Kivach» and «Zaonezshye» populations, which had the lowest levels of genetic diversity, and the «Petrozavodsk seed orchard».

Keywords: *Pinus sylvestris*, native populations, genetic structure, PCR, microsatellites, genetic diversity.

How to cite: Ilyinov A. A., Raevsky B. V. The current state of *Pinus sylvestris* L. gene pool in Karelia // *Sibirskij Lesnoj Zurnal* (Siberian Journal of Forest Science). 2016. N. 5: 45–54 (in Russian with English abstract).