

УДК 575.2:575.22:574.3  
AGRIS F30

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/41/05>

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. В КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ И ПЕРМСКОМ КРАЕ

©Нассонова Е. С., ORCID: 0000-0002-7589-4913, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, [lena.nassonova@mail.ru](mailto:lena.nassonova@mail.ru)

©Васильева Ю. С., ORCID: 0000-0002-2255-2434, канд. биол. наук,  
Пермский государственный национальный исследовательский университет,  
г. Пермь, Россия, [Yulianechaeva@mail.ru](mailto:Yulianechaeva@mail.ru)

©Пришневская Я. В., ORCID: 0000-0003-1513-2682, Пермский государственный национальный исследовательский университет,  
г. Пермь, Россия, [yana\\_prishnivskaya@mail.ru](mailto:yana_prishnivskaya@mail.ru)

©Жуланов А. А., ORCID: 0000-0003-2546-9350, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

## MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF *PINUS SYLVESTRIS* L. POPULATIONS IN KIROV OBLAST AND PERM KRAI

©Nassonova E., ORCID: 0000-0002-7589-4913, Perm State University,  
Perm, Russia, [lena.nassonova@mail.ru](mailto:lena.nassonova@mail.ru)

©Vasileva Yu., ORCID: 0000-0002-2255-2434, Ph.D., Perm State University,  
Perm, Russia, [Yulianechaeva@mail.ru](mailto:Yulianechaeva@mail.ru)

©Prishnivskaya Ya., ORCID: 0000-0003-1513-2682, Perm State University,  
Perm, Russia, [yana\\_prishnivskaya@mail.ru](mailto:yana_prishnivskaya@mail.ru)

©Zhulanov A., ORCID: 0000-0003-2546-9350, Perm State University, Perm, Russia

**Аннотация.** Проведен молекулярно-генетический анализ и идентификация 5 выборок *Pinus sylvestris* L., из Кировской области и Пермского края. Молекулярно-генетический анализ проводили с использованием ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК. У пяти изученных выборок сосны обыкновенной выявлено 126 ISSR-маркеров, из которых 122 ( $P_{95}=0,968$ ) были полиморфными. Проведена молекулярно-генетическая идентификация изученных выборок сосны обыкновенной, выявлены идентификационные ISSR-маркеры и их сочетания, составлены молекулярно-генетические формулы и штрихкоды для каждой изученной выборки. Анализ генетической структуры и дифференциации *P. sylvestris* показал, что выборки распределились в три генетические популяции.

**Abstract.** Molecular-genetic analysis and identification of 5 *Pinus sylvestris* L. hauls, collected in Kirov oblast and Perm krai was provided. Molecular-genetic analysis was provided with using ISSR-method of DNA polymorphism analysis. In 5 researched hauls of *P. sylvestris* 126 ISSR-markers were identified, 122 ( $P_{95}=0.968$ ) were polymorphic. Molecular-genetic identification of researched *P. sylvestris* populations was provided and molecular-genetic formulas and bar-codes were made. Identification ISSR-markers were identified. Genetic structure and differentiation analysis of *P. sylvestris* showed that hauls were distributed in three genetic populations.

*Ключевые слова:* ISSR-маркер, молекулярно-генетическая идентификация, генетическая структура, *Pinus sylvestris* L.

*Keywords:* ISSR-marker, genetic structure, *Pinus sylvestris* L.

Обладая максимальной для всех видов растительности биомассой и биологической продуктивностью, леса являются не только мощным источником органических веществ, но и важнейшим регулятором крупномасштабных природных процессов, оказывающих глобальное воздействие на состояние атмосферы, ее тепловой и гидрологический режим. Леса по праву считаются экологическим каркасом территории, состояние которого во многом определяет экологическую обстановку как в целом на планете, так и в ее отдельных регионах, особенно многолесных. Россия, являющаяся крупнейшей лесной державой, располагает почти 1/4 всех лесных ресурсов планеты. на территории нашей страны сосредоточено 2/3 общей площади бореальных лесов и до 80% общих запасов древесины хвойных пород, имеющих важное хозяйственное значение. Земли лесного фонда России охватывают все множество лесорастительных зон от арктической тундры до лесостепи [1].

Несмотря на то, что лес — возобновляемый ресурс, количество вырубок превышает количество новых посадок (возобновлений). Одной из основных для лесного хозяйства является проблема незаконной заготовки древесины. Согласно данным Министерства природных ресурсов и экологии РФ ущерб от незаконных рубок в 2014 г. составил 14 млрд руб. При расследовании преступлений, связанных с незаконной рубкой леса, основной проблемой является создание экспертной доказательной базы [2]. Ущерб, причиненный незаконной вырубкой, порой может достигать нескольких миллионов рублей [3]. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является видом-эдикатором лесных экосистем, сосновые леса широко распространены в мире, произрастают в основном в умеренной лесной и лесостепной зоне. *P. sylvestris* является одним из основных объектов лесозаготовительной промышленности [4]. Следовательно, необходима разработка мер выявления и контроля незаконных вырубок, а также разработка идентификации древесных видов растений на популяционном уровне. Только на основании точных сведений о популяционно-генетической структуре древесных растений может быть оценен их генетический потенциал и разработан комплекс мероприятий, направленных на сохранение генетического разнообразия в процессе их использования и воспроизводства [5].

*Целью исследования* является анализ генетического разнообразия и поиск идентификационных маркеров для выборок *P. sylvestris* L. на основании ISSR-маркеров в Кировской области и Пермском крае.

#### *Материалы и методы*

Объектами исследований являются пять выборок *P. sylvestris* L., две из которых располагаются в Пермском крае: PsI — на территории Березниковского лесничества, PsII — Закамского лесничества. Три выборки были собраны в Кировской области: PsIII — в Юрьянском лесничестве, PsIV — в Слободском, PsV — на территории Белохолуницкого лесничества. Молекулярно-генетический анализ и выявление идентификационных молекулярных маркеров проводили по результатам ПЦР с пробами ДНК, выделенными как из хвои, так и из древесины. Для проведения молекулярно-генетического анализа собрана хвоя индивидуально с 28–30 деревьев, расположенных не менее чем в 50 метрах друг от друга, всего было исследовано 146 деревьев. Для выделения ДНК из хвои использовали модифицированную добавление в качестве сорбента PVPP (polyvinylpyrrolidone)

методику С. Роджерса [6]. Качество и характеристики ДНК определяли на приборе Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Для молекулярно-генетического анализа и идентификации был использован ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)-метод анализа полиморфизма ДНК [7]. Для ISSR-ПЦР были использованы пять наиболее информативных ISSR-праймеров (Таблица 1), показавшие наибольшую эффективность в геноме данного вида [8] и использованные для молекулярно-генетической идентификации популяций *P. sylvestris* в предыдущих исследованиях других авторов [9].

Таблица 1.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И ТЕМПЕРАТУРА ОТЖИГА ISSR-ПРАЙМЕРОВ

Название ISSR-праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	$T_{отж}$ , °C
ISSR-1	ACA-CAC-ACA-CAC-ACA-CT	56
CR-212	CTC-TCT-CTC-TCT-CTC-TTG	56
CR-215	CAC-ACA-CAC-ACA-GT	56
M27	GAG-AGA-GAG-AGA-GAG-AC	52
X10	AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-C	64

Примечание:  $T_{отж}$  — температура отжига праймера.

Аmplификацию проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) по типичной для ISSR-метода программе: предварительная денатурация 94 °C, 2 мин.; первые пять циклов — 94 °C, 20 сек.;  $t^{\circ}$  отжига, 10 сек.; 72 °C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах — 94 °C, 5 сек.;  $t^{\circ}$  отжига, 5 сек.; 72 °C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 46 до 64 °C (Таблица 1). В качестве отрицательного контроля в реакционную смесь добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем 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, США). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100bp+1.5+3Kb DNA Ladder; ООО СибЭнзим-М, Москва). Определение длин фрагментов проводили с использованием программы QuantityOne в системе гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США). Для изучения генетической изменчивости и молекулярно-генетической идентификации *P. sylvestris* амплифицировано 700 проб ДНК. Для проверки достоверности полученных результатов опыт повторяли не менее трех раз. Компьютерный анализ полученных данных проводили с помощью программы POPGENE 1.31 [10] и с помощью специализированного макроса GenAlE×6 [11] для MS-Excel с определением: доли полиморфных локусов ( $P_{95}$ ), абсолютного числа аллелей ( $n_a$ ), эффективного числа аллелей ( $n_e$ ), ожидаемой ( $H_E$ ) гетерозиготности [12]. На основе матрицы бинарных признаков 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 Treescan 1.3b и POPGENE 1.31. Генетическое расстояние между популяциями ( $D$ ) определяли по формулам М. Нея [13]. Для описания генетической структуры популяции использовали следующие параметры [13]: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_i$ ) во всей популяции, как мера общего генного разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_s$ ) в субпопуляции, как мера ее внутривидового разнообразия; доля межпопуляционного генетического разнообразия

в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций ( $G_{st}$ ). Кластерный анализ исследуемых выборок *P. sylvestris* проводили с помощью программы STRUCTURE 2.3.4, которая использует методы Монте Карло по схеме марковской цепи (Markov Chain Monte Carlo, МСНС), что позволяет минимизировать неравновесие Харди–Вайнберга и неравенство по сцеплению локусов в кластерном анализе индивидов [14], для поиска подходящего количества генетических кластеров путем их индивидуального перебора. Было выполнено 5 прогонов анализа, каждый включал этап «burn in» состоящий из 100000 итераций, и этап сбора данных — 100000 итераций. Количество кластеров (K) находилось в диапазоне от 2 до 6. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [15] была использована веб-программа STRUCTURE Harvester [16]. Данная веб-программа была использована для детекции количества K-групп, которые наилучшим образом соответствуют набору данных, на основе значения коэффициента DeltaK.

Генетическая идентификация была проведена по методике, предложенной С. В. Боронниковой с соавторами в 2013 году на примере природных популяций двух видов *Populus tremula* L. и *Populus balsamifera* L. [8]. Молекулярные маркеры, избранные для идентификации четырех популяций *P. sylvestris*, представлены в виде молекулярно–генетической формулы, при составлении которой использовались так называемые «родовые», «видовые» и «полиморфные» ПЦР ISSR-маркеры. Мономорфные ISSR-маркеры, характерные для вида, обозначены как *PSy*, а полиморфные как *Ps* — характерные только для отдельных выборок сосны обыкновенной; *PINr* — родовые маркеры, для двух видов рода *Pinus*.

Таким образом, в записи молекулярно–генетической формулы указан вид растения, тип амплифицированного ISSR-маркера, его размер и дана характеристика исследуемой части генома посредством указания метода анализа полиморфизма ДНК и номера или последовательности праймера [17]. Для поиска «родовых» маркеров использована ДНК близкого вида из рода *Pinus* — сосны сибирской (*P. sibirica* Du Tour).

Далее составляется штрихкод выборки или популяции. Видовые фрагменты обозначаются средней по толщине линией, а полиморфные тонкой. Линии в молекулярно–генетическом штрихкоде располагаются в порядке уменьшения молекулярного веса соответствующего фрагмента, от большего к меньшему. Для штрихкода принято использовать от 9 до 12 штрихов [18].

#### Результаты и обсуждение

При молекулярно–генетическом анализе *P. sylvestris* выявлено 126 ISSR-маркеров, из которых 122 были полиморфными ( $P_{95}=0,968$ ). Число ISSR-маркеров *P. sylvestris* варьировало в зависимости от праймера от 11 (праймер X10) до 25 (праймер CR-215) а их размеры — от 210 до 1460 пн. В среднем один ISSR-праймер инициировал у *P. sylvestris* синтез 20,7 ISSR-маркеров. Число полиморфных маркеров в общей выборке *P. sylvestris* варьировало от 22 до 27, а доля полиморфных локусов в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,916 до 1,000 (Таблица 2).

Для молекулярно–генетической идентификации выборок важны уникальные (R), то есть встречающиеся только в одной выборке, маркеры. В изученных выборках *P. sylvestris* выявлено 5 уникальных ISSR-маркеров, из которых в выборке PsI выявлен 1, в выборках PsII и PsV по 2 уникальных ISSR-маркера, а в выборках PsIII и PsIV таких ISSR-маркеров выявлено не было.

Таблица 2.

ХАРАКТЕРИСТИКА ISSR-МАРКЕРОВ В ПЯТИ ВЫБОРКАХ *P. sylvestris*

ISSR-праймеры	После-дователь-ность (5'→3')	Длина фраг-ментов, пн	Число полиморфных ISSR-маркеров в выборках					На общую выборку
			PsI	PsII	PsIII	PsIV	PsV	
CR-212	(CT) <sub>8</sub> TG	270–1400	18 (0,947)	21 (0,954)	19 (1,000)	18 (0,947)	13 (0,619)	23 (0,958)
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	220–1250	21 (1,000)	20 (0,869)	11 (0,550)	13 (0,650)	14 (0,736)	25 (0,961)
ISSR-1	(AC) <sub>8</sub> T	220–1350	17 (0,850)	15 (0,937)	18 (0,857)	15 (0,714)	19 (0,950)	25 (1,000)
M-27	(GA) <sub>8</sub> C	240–1000	17 (0,850)	18 (0,583)	17 (0,772)	15 (0,681)	12 (0,705)	22 (0,916)
X-10	(AGC) <sub>6</sub> C	210–1460	18 (0,857)	24 (1,000)	23 (0,958)	25 (1,000)	21 (0,875)	27 (1,000)
Всего ISSR-маркеров (в скобках дана их частота)			91 (0,901)	98 (0,951)	88 (0,830)	86 (0,804)	79 (0,782)	122 (0,968)

Примечание: PsI–PsV — обозначения выборок, в скобках дана частота полиморфных ISSR-маркеров.

Доля полиморфных локусов ( $P_{95}$ ) на общую выборку составила 0,968. Средняя ожидаемая гетерозиготность ( $H_E$ ) на общую выборку *P. sylvestris* составила 0,219. Этот показатель наибольший в выборке PsIV ( $H_E = 0,239$ ), а наименьший ( $H_E = 0,203$ ) — в выборке PsII (Таблица 3). Значение абсолютного числа аллелей ( $n_a$ ) на общую выборку составило 1,984, эффективного числа аллелей ( $n_e$ ) — 1,533.

Наибольшие параметры генетического разнообразия наблюдались в выборке PsIV, а наименьшие в PsII соответственно.

Таблица 3.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ИЗУЧЕННЫХ ВЫБОРКАХ *P. sylvestris*

Выборка	$P_{95}$	$H_E$	$n_a$	$n_e$	$R$
PsI	0,659	0,208 (0,017)	1,698 (0,460)	1,343 (0,352)	1 (0,958)
PsII	0,627	0,203 (0,016)	1,706 (0,457)	1,324 (0,322)	2 (0,961)
PsIII	0,635	0,234 (0,017)	1,698 (0,460)	1,386 (0,348)	0 (1,000)
PsIV	0,603	0,239 (0,017)	1,698 (0,460)	1,403 (0,360)	0 (0,916)
PsV	0,563	0,210 (0,017)	1,650 (0,478)	1,343 (0,337)	2 (1,000)
На общую выборку	0,968	0,219 (0,017)	1,984 (0,125)	1,533 (0,321)	5 (0,968)

Примечание:  $P_{95}$  — доля полиморфных локусов,  $H_E$  — ожидаемая гетерозиготность;  $n_a$  — абсолютное число аллелей на локус;  $n_e$  — эффективное число аллелей на локус (у всех вышеуказанных параметров в скобках даны стандартные отклонения);  $R$  — число редких фрагментов, в скобках указана их доля от общего числа фрагментов.

Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ) на всю выборку равна 0,318; среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам ( $H_S$ ) составило 0,218; доля межвыборочного генетического разнообразия в общем разнообразии ( $G_{ST}$ ) равна 0,312. Наименьшее генетическое расстояние отмечено между выборками, которые принадлежат одной популяции. На самом наименьшем расстоянии располагаются выборки PsI, PsII

( $D=0,090$ ). Наибольшее расстояние наблюдается между выборками *PsI* и *PsIV* ( $D=0,358$ ). Что согласуется с географическими расстояниями (Таблица 4).

На дендрограмме выборки образовали три кластера, с высокой поддержкой бутстрепа – в первый входят выборки *PsI* и *PsII*; во второй — *PsIII* и *PsIV*; в третий — *PsV* (Рисунок 2). Что также согласуется с географическими расстояниями (Таблица 4).

Таблица 4.

ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ ВЫБОРКАМИ (КМ)

	<i>PsI</i>	<i>PsII</i>	<i>PsIII</i>	<i>PsIV</i>	<i>PsV</i>
<i>PsI</i>					
<i>PsII</i>	180				
<i>PsIII</i>	700	500			
<i>PsIV</i>	600	400	90		
<i>PsV</i>	500	400	130	50	

Примечание: *PsI*–*PsV* — обозначения выборок.

На дендрограмме генетического сходства (Рисунок 1) сходные между собой выборки *PsI* и *PsII* объединились в первую генетическую популяцию, обозначенную далее как *PS\_1*, *PsIII* и *PsIV* — во вторую генетическую популяцию (*PS\_2*), к отдельной популяции (*PS\_3*) принадлежит выборка *PsV*.

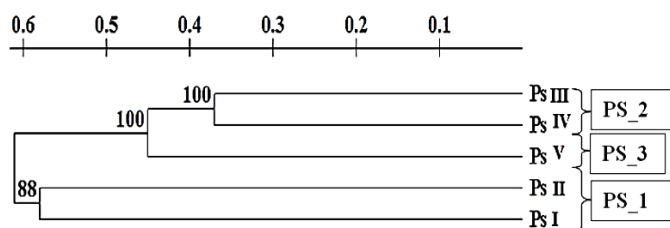


Рисунок 1. UPGMA-дендрограмма генетического сходства исследуемых выборок *P. sylvestris*. Шкала сверху — генетическое расстояние; на дендрограмме цифрами указаны значения бутстрепа (в %); *PsI*–*PsV* — обозначения выборок *PS\_1* — обозначения популяций.

Анализ популяционной структуры с помощью on-line приложения STRUCTURE Harvester, выявил, что наиболее вероятным оказывается разделение исследуемой выборки на три кластера, соответствующим трем генетическим популяциям, при этом наиболее близкими оказываются выборки *PsI* и *PsII* в первом кластере, *PsIII* и *PsIV* во втором кластере (Рисунок 2). В целом, популяционная структура популяций *P. sylvestris* выражена четко, большинство деревьев могут быть отнесены к одной из выявленных генетических популяций с апостериорной вероятностью  $\geq 0,95$ , что говорит о значительном уровне их дифференциации. При этом небольшое число генотипов имеют смешанную генетическую структуру: в выборке *PsII* и выборке *PsIII* присутствуют генотипы, характерные для выборки *PsV* и *PsIV*.

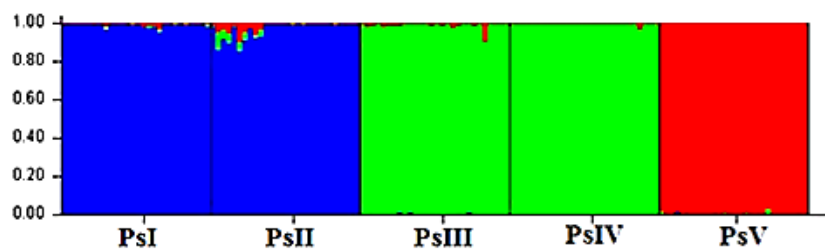


Рисунок 2. Генетическая структура исследованных выборок *P. sylvestris* при  $K=3$ . По вертикали — доля частот аллелей соответствующего кластера (апостериорная вероятность), по горизонтали — обозначение выборок.

Таким образом, на основании кластерного генетического анализа пяти выборок, установлено, что они достоверно распределились в три генетических популяций.

На основе ISSR-спектров, полученных при электрофорезе продуктов ПЦР с пятью эффективными праймерами, удалось обнаружить идентификационные фрагменты или их сочетания для всех изученных выборок. Наибольшую долю у всех выборок составили полиморфные маркеры и общие для отдельных выборок. Выявлены мономорфные фрагменты, которые использовались для видовой идентификации. Наименьшее количество составили уникальные ISSR-маркеры, которые использовались для идентификации отдельных выборок. Также найден один родовой фрагмент, который имеется у двух видов рода *Pinus* —  $PIN_r250_{CR215}$  (Таблица 5).

Таблица 5.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИДЕНТИФИКАЦИОННЫХ ISSR-МАРКЕРОВ  
 ДЛЯ ВЫБОРОК *P. sylvestris*

Праймер	ISSR-маркеры, избранные для идентификации
<i>Мономорфные идентификационные ISSR-маркеры</i>	
CR-215	$PIN_r250_{CR215}$
M27	$PS_v540_{M27}$ ; $PS_v460_{M27}$
<i>Полиморфные идентификационные ISSR-маркеры</i>	
ISSR-1	$PS_{Ip}720_{ISSR-1}$ ; $PS_{IVp}930_{ISSR-1}$ ; $PS_{Vp}1115_{ISSR-1}$ ; $PS_{Vp}880_{CR212}$ ; $PS_{Ip}510_{CR215}$ ; $PS_{Ip}500_{CR215}$ ; $PS_{Vp}420_{CR212}$ ;
CR-212	$PS_{IIp}400_{CR212}$ ; $PS_{IIp}370_{CR212}$ ; $PS_{Vp}290_{CR212}$ ; $PS_{IIIp}290_{CR212}$ ; $PS_{IIp}500_{CR212}$ ; $PS_{IIp}470_{CR212}$
CR-215	$PS_{IIp}810_{CR215}$ ; $PS_{Ip}290_{CR215}$ ; $PS_{IVp}1250_{CR215}$
M27	$PS_{Ip}800_{M27}$ ; $PS_{Ip}780_{M27}$ ; $PS_{IIIp}260_{M27}$
X10	$PS_{Vp}770_{X10}$ ; $PS_{Vp}720_{X10}$ ; $PS_{Vp}250_{X10}$ ; $PS_{IVp}250_{X10}$ ; $PS_{Vp}240_{X10}$ ; $PS_{IIIp}240_{X10}$ ; $PS_{IVp}230_{X10}$

Примечание:  $PIN_r$  — родовой маркер, для двух родов *Pinus*;  $PS_v$  — видовые ISSR-маркеры, характерные для всех популяций;  $PS_{Ip}$ ,  $PS_{IIp}$ ,  $PS_{IIIp}$ ,  $PS_{IVp}$ ,  $PS_{Vp}$  — полиморфные ISSR-маркеры, характерные только для отдельных выборок *P. sylvestris*.

На основании полученных молекулярно-генетических формул были составлены штрихкоды выявленных популяций сосны обыкновенной (Рисунок 3). Как молекулярно-генетическая формула, так и штрихкод позволят идентифицировать принадлежность особей не только к роду и виду, но и к определенной популяции [19].

Таким образом, для трех выявленных генетических популяций *P. sylvestris* были выявлены идентификационные родовые, видовые и полиморфные маркеры, на основании которых были составлены молекулярно–генетические формулы для каждой из выявленных выборок.

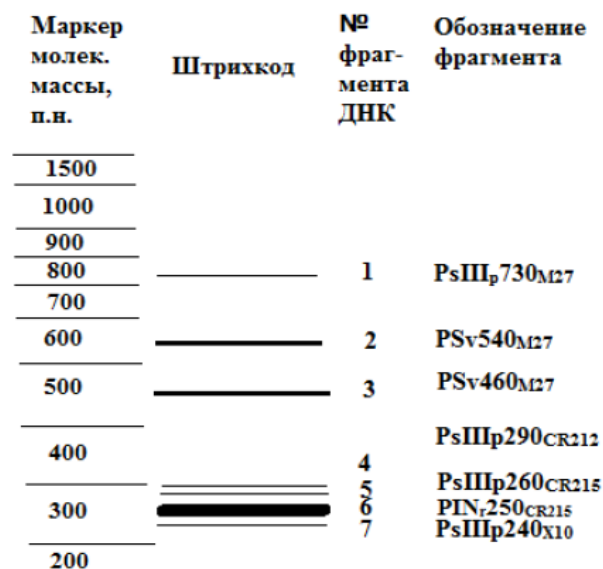


Рисунок 3. Молекулярно–генетический штрихкод популяции *PsIII*. *PINr* — родовые маркеры, для двух видов рода *Pinus*; *PSv* — видовые ISSR-маркеры *P. sylvestris*; *PsIIIp* — полиморфные идентификационные ISSR-маркеры выборки *PsIII*.

#### Заключение

У пяти изученных выборок сосны обыкновенной выявлено 126 ISSR-маркеров, из которых 122 ( $P_{95}=0,968$ ) были полиморфными. Наибольшие параметры генетического разнообразия наблюдались в выборке *PsIV* ( $H_E=0,239$ ;  $n_a=1,698$ ;  $n_e=1,343$ ), а наименьшие в *PsII* ( $H_E=0,203$ ;  $n_a=1,706$ ;  $n_e=1,324$ ). На основании кластерного анализа установлено, что генетические популяции образуют выборки: *PsI* и *PsII* – популяция *PS\_1*, *PsIII* и *PsIV* — популяция *PS\_2*, *PsV* — популяция *PS\_3*. Анализ генетической структуры и дифференциации пяти выборок *P. sylvestris* показал, что выборки распределились те же генетические популяции, что и при кластерном анализе. Для изученных выборок *P. sylvestris* установлены два видовых ISSR-маркера, выявленные у всех изученных популяций, и один родовой. Таким образом, проведена молекулярно-генетическая идентификация некоторых выборок сосны обыкновенной в Пермском крае и Кировской области. Показано, что полученные сочетания фрагментов являются видоспецифичными, стабильными и воспроизводимыми. А это в свою очередь, открывает возможность дальнейшего изучения взаимосвязи генетических и географических характеристик вида *P. sylvestris*, а также является основой для определения места происхождения древесины, что будет способствовать разработке мер борьбы с незаконными рубками леса и уменьшению ущерба лесным экосистемам и бюджету исследованных регионов.

#### Список литературы:

1. Исаев А. С. Актуальные проблемы национальной лесной политики. М.: Типография ЛЕВКО, 2009. 108 с.
2. Клейнхоф И. А. Глобальные аспекты развития лесного сектора экономики // Лесной вестник. 2008. №5. С. 115-119.



3. Блам Ю. Ш., Бабенко Т. И., Машкина Л. В. Экономические последствия государственного регулирования лесного сектора // Регион: экономика и социология. 2011. №2. С. 211-222.
4. Лесной план Кировской области на 2008-2020 годы // Министерство природных ресурсов, лесного хозяйства и экологии Кировской области. Киров, 2015. Режим доступа: [www.kirovreg.ru/publ/akoup.nsf/](http://www.kirovreg.ru/publ/akoup.nsf/) (дата обращения 16.03.18).
5. Ларионова А. Я., Кравченко А. Н., Экарт А. К., Орешкова Н. В. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций лесообразующих видов хвойных в Средней Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2007. Т. 24. №2-3. С. 235-242.
6. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. V. 1. №19. P. 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>.
7. Zietkiewicz E. 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>.
8. 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: тезисы научной конференции. Ростов-на-Дону, 2013. С. 17.
9. 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. DOI: 10.7868/S0016675815120139.
10. Yeh F. C., Young R. C., Mao J. et al. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. Alta. 1999. P. 238.
11. 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>.
12. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.
13. Nei M. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, 1975. 278 p.
14. Smulders M. J. M., van der Schoot J., Arens P. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.) // Molecular Ecology Notes. 2001. V. 1. №3. P. 188-190. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00071.x>.
15. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Molecular ecology. 2005. V. 14. №8. P. 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
16. Earl A., von Holdt M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation genetics resources. 2012. V. 4. №2. P. 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
17. Боронникова С. В., Бобошина И. В. Пат. 2012119341 Российская Федерация А01Н1/00. Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений. Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Пермский государственный

национальный исследовательский университет» №2012119341; заявл.11.05.2012; опубл. 10.02.2014.

18. Боронникова С. В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой уничтожения видов растений. Пермь, 2008. 120 с.

19. Боронникова С. В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь, 2013. 223 с.

#### References:

1. Isaev, A. S., & Korovin, G. N. (2009). Aktual'nye problemy natsional'noi lesnoi politiki. Moscow, Tipografiya LEVKO, 108. (in Russian).

2. Kleinhof, I. A. (2008). Global aspects of sustainable development of the forest sector. *Forest Herald*, (5), 115-119. (in Russian).

3. Blam, Yu. Sh., Babenko, T. I., Mashkina, L. V., & Ermolaev, O. V. (2011). Ekonomicheskie posledstviya gosudarstvennogo regulirovaniya lesnogo sektora. *Region: ekonomika i sotsiologiya*, (2), 211-222. (in Russian).

4. Lesnoi plan Kirovskoi oblasti na 2008-2020 gody. (2015). Ministerstvo prirodnykh resursov, lesnogo khozyaistva i ekologii Kirovskoi oblasti. Kirov. Available at: [www.kirovreg.ru/publ/akoup.nsf/](http://www.kirovreg.ru/publ/akoup.nsf/), accessed 16.03.18.

5. Larionova, A. Ya., Kravchenko, A. N., Ekart, A. K., & Oreshkova, N. V. (2007). Geneticheskoe raznoobrazie i differentsiatsiya populyatsii lesoobrazuyushchikh vidov khvoinykh v Srednei Sibiri. *Khvoinye boreal'noi zony*, 24(2-3), 235-242. (in Russian).

6. Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 1(19), 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>.

7. Zietkiewicz, E. (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>.

8. Boboshina, I. V., Nechaeva, Yu. S., Vidyakin, A. I., & Boronnikova, S. V. (2013). Podbor praimerov dlya provedeniya ISSR-analiza polimorfizma DNK *Pinus sylvestris* L. In: *Molecular genetic approaches in taxonomy and ecology. Abstracts of the Scientific Conference March 25th-29th 2013 (Rostov-on-Don, Russia)*. Rostov-on-Don, SSC RAS Publishers, 17. (in Russian).

9. Vidyakin, A. I., Boronnikova, S. V., Nechayeva, Y. S., Pryshnivskaya, Y. V., & Boboshina, I. V. (2015). Genetic variation, population structure, and differentiation in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the northeast of the Russian plain as inferred from the molecular genetic analysis data. *Russian Journal of Genetics*, 51(12), 1213-1220. doi:10.7868/S0016675815120139.

10. 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.

11. 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>.

12. Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press, 512.

13. Nei, M. (1975). *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland Publishing Company.

14. Smulders, M. J. M., Van Der Schoot, J., Arens, P., & Vosman, B. (2001). Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes*, 1(3), 188-190. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00071.x>.
15. Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
16. Earl, A., & von Holdt, M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
17. Boronnikova, S. V., & Boboshina, I. V. Pat. 2012119341. Rossiiskaya Federatsiya A01H1/00. Sposob molekulyarno-geneticheskoi identifikatsii populyatsii drevesnykh vidov rastenii. Zayavitel' i patentoobladatel' FGBOU VPO "Permskii gosudarstvennyi natsional'nyi issledovatel'skii universitet" no. 2012119341; zayavl. 11.05.2012; opubl. 10.02.2014. (in Russian).
18. Boronnikova, S. V. (2008). Molekulyarno-geneticheskaya identifikatsiya i pasportizatsiya redkikh i nakhodyashchikhsya pod ugrozoi unichtozheniya vidov rastenii. Perm, 120. (in Russian).
19. Boronnikova, S. V. (2013). Molekulyarno-geneticheskii analiz i otsenka sostoyaniya genofondov resursnykh vidov rastenii Permskogo kraja. Perm, 223. (in Russian).

Работа поступила  
в редакцию 26.02.2019 г.

Принята к публикации  
02.03.2019 г.

*Ссылка для цитирования:*

Нассонова Е. С., Васильева Ю. С., Пришнивская Я. В., Жуланов А. А. Молекулярно-генетический анализ и идентификация популяций *Pinus sylvestris* L. в Кировской области и Пермском крае // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5. №4. С. 47-57. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/41/05>.

*Cite as (APA):*

Nassonova, E., Vasileva, Yu., Prishnivskaya, Ya., & Zhulanov, A. (2019). Molecular-Genetic Identification and Analysis of *Pinus sylvestris* L. Populations in Kirov Oblast and Perm Krai. *Bulletin of Science and Practice*, 5(4), 47-57. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/41/05>. (in Russian).