Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 50. С. 101–118

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.22
doi: 10.17223/19988591/50/5

О.В. Шейкина[1], Ю.Ф. Гладков[2]

[1] Поволжский государственный технологический университет, г. Йошкар-Ола, Россия
[2] Филиал ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл», г. Йошкар-Ола, Россия

Генетическое разнообразие и дифференциация ценопопуляций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), сформированных в болотных и суходольных экотопах

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00483) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения базовой части государственного задания высшим учебным заведениям и научным организациям в сфере научной деятельности (г/б НИР 37.8531.2017).

На основе метода полимеразной цепной реакции с ISSR-праймерами проведены исследования генетической изменчивости и дифференциации трех болотных и четырех суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной в Республике Марий Эл. С использованием шести ISSR-праймеров выявлено 215 ISSR-локусов, из которых 208 оказались полиморфными. Количество обнаруженных ISSR-локусов варьировало в разных ценопопуляциях от 162 до 194. Показатели генетического разнообразия исследованных ценопопуляций существенно варьировали (P = 67,9–88,5%; Na = 1,679–1,842; Ne = 1,279–1,331; He = 0,174–0,207) и не зависели от почвенно-гидрологических условий. Установлено, что суходольные и болотные ценопопуляции статистически значимо (p<0,01) различались по частоте встречаемости ISSR-маркеров, полученных с пятью ISSR-праймерами из шести, что указывает на отличающуюся генетическую структуру. На генетическую изменчивость между группами суходольных и болотных ценопопуляций пришлось 9% всего генетического полиморфизма. Общий уровень генетической подразделённости ценопопуляций составил 17,0% (G_{ST} = 0,170), следовательно, основная часть генетической изменчивости находилась внутри изученных ценопопуляций (83%).

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; *ISSR-маркеры; внутри- и межценопопуляционная изменчивость; влажность почвы.*

Введение

Одной из ключевых проблем биологии является изучение механизмов формирования внутривидовой изменчивости, в том числе механизмов образования популяционной структуры видов под воздействием гетерогенных условий окружающей среды. Для изучения экологических механизмов дивергенции популяций у древесных видов большой интерес представляет

сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), которая, обладая высокой экологической пластичностью, формирует ценопопуляции в различных почвенно-гидрологических условиях. С целью изучения влияния экологических факторов на фенотипическую и генетическую дифференциацию популяций для исследований часто выбирают систему контрастных объектов «болото – суходол». Между болотными и суходольными древостоями сосны обыкновенной ранее выявлены различия по размеру пыльцевых зерен [1], окраске микростробил и семян [2], числу нераскрывающихся макростробил [3]. Установлено, что для деревьев из болотных популяций разных видов Pinacea характерны большее число вторичных перетяжек и ядрышек в интерфазных ядрах, наличие широкого спектра хромосомных мутаций и патологий по сравнению с деревьями из суходольных популяций [4]. На основе анализа изоферментов выявлены генетический полиморфизм и наличие репродуктивного барьера между болотными и суходольными популяциями [5, 6]. Предполагается, что фенотипическая и генетическая дифференциация болотных и суходольных популяций сосны обыкновенной являются следствием совместного действия репродуктивной изоляции и дизруптивного отбора в условиях контрастных экотопов [7]. Причиной возникновения репродуктивной изоляции между смежными суходольными и болотными насаждениями сосны обыкновенной в условиях Средней Сибири и Русской Равнины является стабильная асинхронность фенологических фаз пыления и рецепции деревьев, вызванная различиями в гидротермических режимах почвы [6].

Таким образом, полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о существование фенотипической и генетической дифференциации между популяциями сосны обыкновенной, произрастающими в болотных и суходольных экотопах. Однако необходимо отметить, что до сих пор для изучения влияния почвенно-гидрологических условий на генетическую дифференциацию популяций древесных видов в основном применялся анализ полиморфизма продуктов экспрессии генов (изоферментов). В то же время в последнее десятилетие ДНК-маркеры стали общепризнанным инструментарием для проведения популяционно-генетических исследований. Поэтому необходимы исследования, направленные на изучение механизмов формирования популяционной структуры древесных растений с использованием более информативных методов молекулярно-генетического анализа, позволяющих выявлять различия на уровне ДНК.

Цель работы – изучить показатели генетического разнообразия и дифференциации ценопопуляций сосны обыкновенной, произрастающих в контрастных болотных и суходольных условиях на основе использования ISSR-маркеров.

Материалы и методики исследования

Исследования проведены на территории Республики Марий Эл, находящейся в среднем течении р. Волга на территории Среднего Поволжья.

Среднее Поволжье расположено в Европейской части России между 54° и 58° с.ш. и между 44° и 52° в.д. В качестве объектов исследования подобраны две группы ценопопуляций сосны обыкновенной, произрастающие на песчаных почвах с разным режимом увлажнения на территории четырех лесничеств (табл. 1). Первая группа ценопопуляций представляла собой четыре суходольных насаждения, произрастающие на сухих и влажных песках. Возраст суходольных насаждений варьировал от 50 до 90 лет. Суходольные насаждения представлены сосняком лишайниковым (III класс бонитета), брусничным (I класс бонитета) и лишайниково-брусничным (II класс бонитета). Вторая группа ценопопуляций включала три насаждения сосны обыкновенной, сформированные на верховых болотах. Все болотные насаждения, сформированные в типе условия произрастания A_5, представляли собой сосняк сфагновый (V класс бонитета). Для изученных болот характерен практически сплошной сфагновый покров, состоящий из нескольких видов сфагнума. Все ценопопуляции представляли собой либо чистые насаждения сосны обыкновенной, либо доля участия данного вида составляла 90%. С учетом того, что наиболее интенсивное изреживание древостоев в ходе естественного отбора у сосны обыкновенной наблюдается в возрасте до 40 лет, для исследований подобраны ценопопуляции возраста 40 лет и выше. Все насаждения находились на территории Республики Марий Эл, сформированы в однородных климатических условиях. В каждой из ценопопуляций для молекулярно-генетического анализа отобрано по 30 деревьев, произрастающих на расстоянии не менее 40–50 м друг от друга.

ДНК для анализа генетического полиморфизма выделена из камбиального слоя ствола с использованием CTAB-метода [8]. Для выявления генетической изменчивости и дифференциации ценопопуляций применен ISSR-анализ с праймерами $(CA)_6AGCT$, $(CA)_6AG$, $(CA)_6GT$, $(CA)_6AC$, $(AG)_8T$ и $(AG)_8GCT$ [9]. Для амплификации ДНК с ISSR-праймерами использована следующая реакционная смесь общим объемом 10 мкл: 1 мкл ПЦР-буфера; 0,2 мкл 10 мМ dNTPs; 0,1 мкл 100мкМ праймера; 1 мкл образца ДНК; 0,1 мкл Taq-полимеразы (2 ед/мкл); 7,6 мкл воды. Режим ПЦР: 5 мин денатурация при 94°С, 35 циклов: 0,5 мин денатурация при 94°С, 45 с отжиг при 60°С, элонгация 45 с при 72°С, финальная элонгация в течение 7 мин при 72°С. ПЦР выполнена с использованием коммерческого набора Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия) и термоциклера MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Визуализация результатов ПЦР проведена путем электрофореза в 1,5% агарозном геле в TBE буфере. Фиксирование результатов и обработка данных выполнены с использованием системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США) и программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. Длины обнаруженных амплифицированных фрагментов ДНК рассчитаны по отношению к маркеру длин ДНК «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия). На основе анализа электрофореграмм составлены бинарные матрицы, в которых присутствующие ПЦР-фрагменты обозначались «1» (аллель 1), а отсутствующие «0» (аллель 0).

Таблица 1 [Table 1]

Местонахождение и характеристика ценопопуляций сосны обыкновенной в Республики Марий Эл

[Location and characteristics of the *Pinus sylvestris* L. coenopopulations in the Mari El Republic]

Шифр ценопопуляции [Coenopopulation code]	Местонахождение [Location]	Возраст, лет [Age, year]	Состав [Stand composition]	Полнота / бонитет [Stand density / bonitet]	Тип леса [Forest type]	Тип условий произрастания / почвы [Forest growth conditions / soil]
Суходольные ценопопуляции [Upland coenopopulations]						
UOL	Учебно-опытное лесничество, квартал 77 [Uchebno-Opytnoe forestry, forest compartment 77]	90	10Ps	0,9 / I	бр [ling]	A_2 – влажный сосновый лес / влажный песок [Fresh coniferous forest / fresh sand]
KL	Килемарское лесничество, квартал 107 [Kilemarskoe forestry, forest compartment 107]	85	10Ps1Bp	0,8 / I	бр [ling]	A_2 – влажный сосновый лес / влажный песок [Fresh coniferous forest / fresh sand]
ML	Моркинское лесничество, квартал 19 [Morkinskoe forestry, forest compartment 19]	50	10Ps	0,7 / III	лш [lich]	A_1 – сухой сосновый лес / сухой песок [A_1 - dry coniferous forest / dry sand]
PL	Пригородное лесничество, квартал 17 [Prigorodnoe forestry, forest compartment 17]	80	10Ps	0,7 / II	лш-бр [ling-lich]	A_1A_2 – переходный тип соснового леса / сухой–влажный песок [Transitional type of coniferous forest / sand-fresh sand]
Болотные ценопопуляции [Bog land coenopopulations]						
Izi Kup	Пригородное лесничество, квартал 17, болото «Изи Куп» [Prigorodnoe forestry, bog Izi Kup, forest compartment 17]	60	10Ps	0,6 / V	сфаг [sphag]	A_5 – сосновый лес на болотистых почвах / мокрый песок [Coniferous forest in boggy soil / wet sand]
Ilushkino	Пригородное лесничество, болото «Илюшкино» квартал 34 [Prigorodnoe forestry, bog Iluskino, forest compartment 34]	40	10Ps1Bp	0,7 / V	сфаг [sphag]	A_5 – сосновый лес на болотистых почвах / мокрый песок [Coniferous forest in boggy soil / wet sand]

Продолжение табл. 1 [Table 1 (cont.)]

Шифр ценопопуляции [Coenopopulation code]	Местонахождение [Location]	Возраст, лет [Age, year]	Состав [Stand composition]	Полнота / бонитет [Stand density / bonitet]	Тип леса [Forest type]	Тип условий произрастания / почвы [Forest growth conditions / soil]
45 km	Пригородное лесничество, болото «45-й километр», квартал 3 [Prigorodnoe forestry, bog 45 km, forest compartment 3]	100	10Ps	0,8 / V	сфаг [sphag]	A_5 – сосновый лес на болотистых почвах / мокрый песок [Coniferous forest in boggy soil / wet sand]
Шифр ценопопуляции [Coenopopulation code]	Местонахождение [Location]	Возраст, лет [Age, years]	Состав [Stand composition]	Полнота / бонитет [Stand density / bonitet]	Тип леса [Forest type]	Тип условий произрастания / почвы [Forest growth conditions / soil]
Суходольные ценопопуляции [Upland cenopopulations]						
UOL	Учебно-опытное лесничество, квартал 77 [Uchebno-Opytnoe forestry, forest compartment 77]	90	10Ps	0,9 / I	бр [ling]	A_2 – влажный сосновый лес / влажный песок [Fresh coniferous forest / wet sand]
KL	Килемарское лесничество, квартал 107 [Kilemarskoe forestry, forest compartment 107]	85	10Ps1Bp	0,8 / I	бр [ling]	A_2 – влажный сосновый лес / влажный песок [Fresh coniferous forest / wet sand]
ML	Моркинское лесничество, квартал 19 [Morkinskoe forestry, forest compartment 19]	50	10Ps	0,7 / III	лш [lich]	A_1 – сухой сосновый лес / сухой песок [A_1 - dry coniferous forest / dry sand]
PL	Пригородное лесничество, квартал 17 [Prigorodnoe forestry, forest compartment 17]	80	10Ps	0,7 / II	лш-бр [ling-lich]	A_1A_2 –переходный тип соснового леса / сухой-влажный песок [Transitional type of coniferous forest / dry sand-wet sand]
Болотные ценопопуляции [Bog land cenopopulations]						
Izi Kup	Пригородное лесничество, квартал 17, болото «Изи Куп» [Prigorodnoe forestry, Izi Kup bog, forest compartment 17]	60	10Ps	0,6 / V	сфаг [sphag]	A_5 – сосновый лес на болотистых почвах / мокрый песок [Coniferous forest in boggy soil / wet sand]

Окончание табл. 1 [Table 1 (end)]

Шифр ценопопуляции [Coenopopulation code]	Местонахождение [Location]	Возраст, лет [Age, year]	Состав [Stand composition]	Полнота / бонитет [Stand density / bonitet]	Тип леса [Forest type]	Тип условий произрастания / почвы [Forest growth conditions / soil]
Ilushkino	Пригородное лесничество, болото «Илюшкино» квартал 34 [Prigorodnoe forestry, Iluskino bog, forest compartment 34]	40	10Ps1Bp	0,7 / V	сфаг [sphag]	A_5 – сосновый лес на болотистых почвах / мокрый песок [Coniferous forest in boggy soil / wet sand]
[45 km]	Пригордное лесничество, болото «45-й километр», квартал 3 [Prigorodnoe forestry, 45 km bog, forest compartment 3]	100	10Ps	0,8 / V	сфаг [sphag]	A_5 – сосновый лес на болотистых почвах / мокрый песок [Coniferous forest in boggy soil / wet sand]

Примечание. Состав: Ps – сосна обыкновенная *Pinus sylvestis* L., Bp – береза повислая *Betula pendula* Roth. Типы леса: бр – брусничный, лш – лишайниковый, бр-лш – брусничнo-лишайниковый, сфаг – сфагновый.
[*Note.* Stand composition: Ps - *Pinus sylvestis* L., Bp - *Betula pendula* Roth. Forest type: ling - lingonberry, lich - lichen, ling-lich - lingonberry-lichen, sphag - sphagnum].

Расчет параметров генетической изменчивости и подразделённости ценопопуляций выполнен в программе POPGENE 1.31 [10]. Генетическая дифференциация ценопопуляций оценивалась на основе анализа генетической дистанции Нея [11] и G_{ST}-статистики Нея [12]. Для оценки статистической значимости различий встречаемости аллелей использован χ^2-тест, различия считались статистически значимыми при $p<0,01$. Дендрограмма генетического взаимоотношения ценопопуляций построена в программе POPTREEW [13] методом UPGMA на основе генетических дистанций Нея [11]. Анализ молекулярной вариансы (AMOVA) выполнен в программе GenAlEx [14], анализ главных координат (PCoA) и тест Мантеля для установления корреляции между матрицей географических и генетических дистанций по Нею выполнены с использованием программы PAST 3.25 [15].

Результаты исследования и обсуждение

ISSR-маркеры позволяют провести оценку уровня внутрипопуляционного и межпопуляционного генетического разнообразия, а также определить степень дивергенции популяций. ISSR-маркеры относятся к полилокусным ДНК-маркерам, у которых при использовании одного праймера обнаруживается множественное число локусов. В результате ПЦР с шестью ISSR-праймерами у 240 деревьев из семи ценопопуляций выявлено всего 215 локусов, из которых 208 оказались полиморфными. Количество локусов

у разных праймеров варьировало от 27 до 40, а их длина находилась в пределах от 200 до 2 500 п.н. Из табл. 2 видно, что изученные ценопопуляции отличались по количеству обнаруженных ISSR-локусов.

Таблица 2 [Table 2]

Параметры генетического разнообразия ценопопуляций сосны обыкновенной [Genetic diversity indicators of *Pinus sylvestris* L. coenopopulations] ($M \pm m_M$)

Ценопопуляции [Coenopopulations]	N	P	Na	Ne	He
Суходольные ценопопуляции [Dry land coenopopulations]					
UOL	187	79,1	1,791±0,028	1,321±0,021	0,205±0,011
KL	190	77,2	1,772±0,029	1,331±0,022	0,207±0,012
ML	162	67,9	1,679±0,032	1,289±0,022	0,182±0,012
PL	179	75,8	1,758±0,029	1,279±0,023	0,174±0,012
Для суходольных ценопопуляций [Across all dry land population. Total]	190	94,9	1,949±0,015	1,347±0,011	0,224±0,006
Болотные ценопопуляции [Bog land coenopopulations]					
Izi Kup	183	79,3	1,795±0,028	1,299±0,022	0,187±0,012
Ilushkino	194	84,2	1,842±0,025	1,308±0,020	0,201±0,011
45 km MD	192	88,5	1,805±0,027	1,316±0,022	0,201±0,012
Для болотных ценопопуляций [Across all bog land population]	194	93,5	1,935±0,014	1,327±0,014	0,211±0,006
Для всех ценопопуляций [Across all coenopopulations]	215	97,2	1,972±0,010	1,359±0,008	0,232±0,004
Ценопопуляции [Coenopopulations]	N	P	Na	Ne	He
Суходольные ценопопуляции [Dry land cenopopulations]					
UOL	187	79,1	1,791±0,028	1,321±0,021	0,205±0,011
KL	190	77,2	1,772±0,029	1,331±0,022	0,207±0,012
ML	162	67,9	1,679±0,032	1,289±0,022	0,182±0,012
PL	179	75,8	1,758±0,029	1,279±0,023	0,174±0,012
Для суходольных ценопопуляций [Across all dry land oenopopulations. Total]	190	94,9	1,949±0,015	1,347±0,011	0,224±0,006
Болотные ценопопуляции [Bog land cenopopulations]					
Izi Kup	183	79,3	1,795±0,028	1,299±0,022	0,187±0,012
Ilushkino	194	84,2	1,842±0,025	1,308±0,020	0,201±0,011
45 km MD	192	88,5	1,805±0,027	1,316±0,022	0,201±0,012
Для болотных ценопопуляций [Across all bog land population. Total]	194	93,5	1,935±0,014	1,327±0,014	0,211±0,006
Для всех ценопопуляций [Across all coenopopulations. Total]	215	97,2	1,972±0,010	1,359±0,008	0,232±0,004

Примечание. N – количество локусов; P – процент полиморфных локусов, Na – наблюдаемое число аллелей на локус; Ne – эффективное число аллелей; He – ожидаемая гетерозиготность. [*Note.* N - Number of loci; P - Percentage of polymorphic loci; Na - Observed number of alleles per loci; Ne - Effective number of alleles; He - Expected heterozygosity].

Наименьшее количество ISSR-локусов обнаружено в суходольной ценопопуляции из Моркинского лесничества «МЛ» (162 шт.), в то время как наибольшее количество наблюдалось в болотной ценопопуляции «Илюшкино» (194 шт.).

Доля полиморфных локусов при 100-процентном критерии полиморфности в большинстве случаев оказалась выше у выборок деревьев из болотных ценопопуляций (79,3–88,5%) по сравнению с деревьями из суходольных насаждений (67,9–79,1%). Также для болотных ценопопуляций выявлены наибольшие значения наблюдаемого числа аллелей на локус (от 1,795 до 1,842). Напротив, для суходольных ценопопуляций установлены наименьшие значения наблюдаемого числа аллелей на локус (от 1,679 до 1,791). Интересно отметить, что суходольные ценопопуляции различались между собой в большей мере по эффективному числу аллелей и ожидаемой гетерозиготности, чем болотные. Об этом свидетельствует тот факт, что именно в суходольных ценопопуляциях выявлены как минимальные значения эффективного числа аллелей и ожидаемой гетерозиготности (1,279 и 0,174 соответственно), так и максимальные (1,331 и 0,207 соответственно). В целом значения основных показателей генетического разнообразия ISSR-маркеров свидетельствовали о высоком уровне генетического полиморфизма изученных болотных и суходольных ценопопуляций, так как полученные значения не уступали аналогичным показателям, установленным для сосны обыкновенной другими авторами с использованием того же вида ДНК-маркеров [9, 16].

Обобщенные значения параметров генетического разнообразия для суходольных и болотных ценопопуляций оказались близкими: доля полиморфных локусов составила 94,9 и 93,5%, наблюдаемое число аллелей – 1,949 и 1,935, эффективное число аллелей – 1,347 и 1,327 и ожидаемая гетерозиготность – 0,224 и 0,211 соответственно для суходолов и болот. Существенной зависимости уровня генетического разнообразия, выраженного через гетерозиготность, от почвенно-экологических условий не выявлено. Другими авторами на основе анализа разных видов молекулярных маркеров для популяций древесных видов также показано отсутствие связи между уровнем гетерозиготности и почвенно-экологическими условиями [5, 17, 18].

Свидетельством отличающейся генетической структуры может служить разная частота встречаемости ПЦР-фрагментов (аллелей). Анализ встречаемости ISSR-маркеров у обобщенных выборок деревьев из суходольных и болотных экотопов показал, что одинаковые ПЦР-фрагменты могут встречаться в разных ценопопуляциях как с близкой, так и с существенно различающейся частотой. Например, при использовании праймера $(CA)_6AC$ ПЦР-фрагмент длинной 2 500 п.н. обнаружен у 70% деревьев из болотных ценопопуляций. У группы деревьев из суходольных ценопопуляций тот же самый фрагмент найден только у 15% деревьев. В то же время для ряда ПЦР-фрагментов установлена близкая встречаемость у сравниваемых групп деревьев. Например, близкой встречаемостью характеризуются полученные

с праймером $(CA)_6AC$ ПРЦ-фрагменты длинной 1 450, 740, 450 п.н. и др. Сравнение рядов распределения встречаемости ПЦР-фрагментов у выборок деревьев из болотных и суходольных экотопов выполнено на основе расчета критерия χ^2 (табл. 3). Установлено, что различия математически значимы для 5 случаев из 6 ($p<0,01$). Только для праймера $(AG)_8T$ установлено, что частоты встречаемости ПЦР-фрагментов у выборок деревьев из болотной и суходольных ценопопуляций отличались статистически не значимо. Выявленная статистическая значимость различий встречаемости ISSR-маркеров, полученных с пятью праймерами, позволяет говорить об отличающейся генетической структуре болотных и суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной, сформированных в относительно однородных климатических условиях в пределах Республики Марий Эл. Формирование отличающейся генетической структуры может происходить вследствие ярко выраженной репродуктивной изоляции между суходольными и болотными популяциями, выявленной ранее для сосны обыкновенной [6]. Ранее также были установлены различия в количестве аллелей аллозимных локусов для насаждений сосны обыкновенной и сосны черной, произрастающих в разных почвенно-экологических условиях [5, 17].

Таблица 3 [Table 3]

Результаты χ^2-теста встречаемости ISSR-маркеров в болотных и суходольных ценопопуляциях
[Result of Chi-square tests for occurrence of ISSR-markers in the bog land and dry land coenopopulations]

Критерий χ^2 [Criterion χ^2]	Значение χ^2 для различных ISSR-праймеров [Value χ^2 for different ISSR-primers]					
	$(CA)_6AGCT$	$(CA)_6AG$	$(CA)_6GT$	$(CA)_6AC$	$(AG)_8T$	$(AG)_8GCT$
Расчетный χ^2 [Calculated χ^2]	189,21	135,39	196,94	337,80	46,63*	492,17
Табличный χ^2, $p<0,01$ [Table χ^2, $p<0.01$]	63,87	72,06	65,25	70,70	54,05	72,06

Примечание. * статистически не значимо ($p<0,01$).
[*Note.* * not significant, $p<0.01$].

Наименьшие генетические дистанции Нея установлены между выборками деревьев из суходольных ценопопуляций «ML» и «PL» (0,100) и между болотными ценопопуляциями «Izi Kup» и «45 km» (0,111). Самые большие значения генетической дистанции Нея выявлены между древостоем болота «Изи Куп» и суходольным насаждением «PL» (0,317), а также между болотной ценопопуляцией «45 km» и суходольной ценопопуляцией «KL» (0,308). Построенная методом UPGMA дендрограмма показала, что болотные насаждения составляют отдельный кластер (рис. 1). Это может указывать на наличие генетических процессов, обусловливающих дивергенцию суходольных и болотных ценопопуляций сосны обыкновенной.

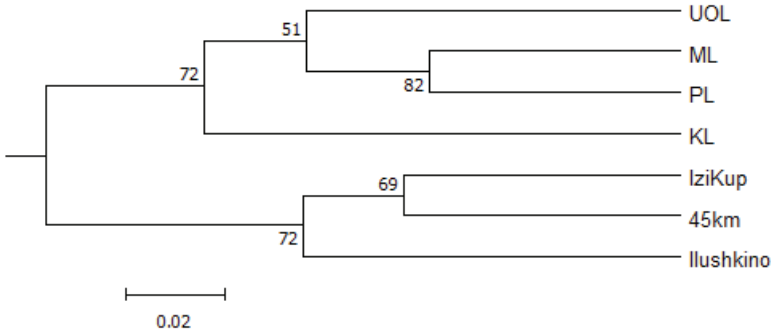

Рис. 1. UPGMA дендрограмма, построенная с использованием генетической дистанции по Нею между болотными и суходольными ценопопуляциями. В узлах ветвления приведены значения бутсрэп-поддержки (10 000 репликаций)
[**Fig. 1.** UPGMA tree constructed using Nei's genetic distances of bog land and dry land coenopopulations]

На основе результатов анализа главных координат (PCoA) все изученные ценопопуляции можно разделить на 3 группы (рис. 2). В первую группу отнесены все болотные ценопопуляции (Изи Куп, Илюшкино и 45 км), вторую группу составили суходольные ценопопуляции из Пригородного лесничества (PL), Моркинского лесничества (ML) и Учебно-опытного лесничества (UOL).

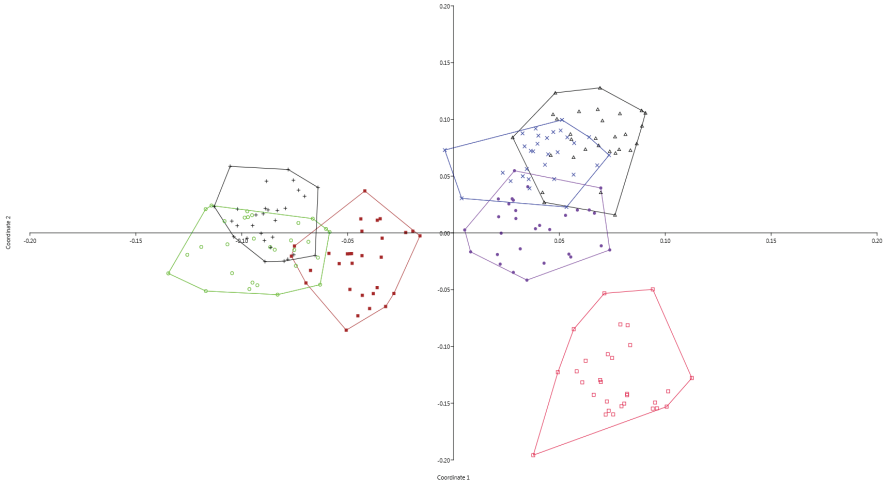

Рис. 2. Расположение в пространстве главных координат (PCoA) деревьев сосны обыкновенной из суходольных и болотных ценопопуляций
[**Fig. 2.** Projection of *Pinus sylvestris* L. individuals from upland and bog land coenopopulations on the two-coordinate system according to the PCoA analysis]
● UOL; □ KL; × ML; Δ PL; ○ Izi Kup; ■ Ilushkino; + 45 km

Обособленное положение ценопопуляции из Килемарского лесничества (KL) может быть объяснено некоторым удалением данного насаждения от всех других, вследствие чего может наблюдаться изоляция расстоянием. Для оценки влияния изоляции расстоянием выполнен тест Мантеля, который показал наличие слабой положительной корреляции между генетической и географической дистанциями для изученных ценопопуляций сосны обыкновенной (R = 0,3085, p = 0,1728).

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) показал, что в составе общей генетической изменчивости 9% генетического разнообразия приходилось на изменчивость между группами суходольных и болотных ценопопуляций, 13% – на изменчивость между ценопопуляциями внутри групп и 78% – на внутрипопуляционный полиморфизм (табл. 4).

Оценка структуры генетического разнообразия и дифференциации по ISSR-локусам выполнена путем расчетов ожидаемой доли гетерозиготных генотипов во всей выборке (H_T), ожидаемой доли гетерозиготных генотипов в ценопопуляциях (H_S) и показателя генетической подразделённости (G_{ST}) (табл. 5). Ожидаемая доля гетерозигоных генотипов для всех суходольных и болотных ценопопуляций, а также ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельных суходольных и болотных ценопопуляциях оказались близкими (0,222 и 0,211; 0,192 и 0,192 соответственно). Суходольные ценопопуляции более генетически дифференцированы друг от друга по сравнению с болотными, на что указывает большее значение показателя генетической подразделенности G_{ST} (0,138 против 0,093).

Таблица 4 [Table 4]

Значения молекулярной вариансы (AMOVA) в ценопопуляциях сосны обыкновенной
[Values of molecular variance (AMOVA) for *Pinus sylvestris* coenopopulations]

Источник изменчивости [Source of variation]	Число степеней свободы [Degrees of freedom, df]	Сумма квадратов [Sum of squares, SS]	Средний квадрат [Mean square, MS]	Дисперсия [Variance, V]	Процент изменчивости [Percentage of variation]
Между группами ценопопуляций [Among groups of coenopopulations]	1	471,96	471,96	3,01	9
Между цепопуляциями внутри групп [Among coenopopulations within groups]	5	810,63	162,13	4,52	13
Внутри ценопопуляций [Within coenopopulations]	203	5371,87	26,46	26,46	78
Итого [Total]	209	6654,46		33,99	100

Таблица 5 [Table 5]

Показатели структуры генетического разнообразия и дифференциации болотных и суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной [Indicators of the structure of genetic diversity and differentiation of the bog land and dry land *Pinus sylvestris* coenopopulations] ($M \pm m_M$)

Группа ценопопуляций [Group of coenopopulations]	Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов во всей популяции [The expected proportion of heterozygous genotypes in the general population], H_T	Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в ценопопуляциях [The expected proportion of heterozygous genotypes in the coenopopulations], Hs	Показатель генетической подразделённости, [Genetic differentiation index], G_{ST}
Суходольные ценопопуляции [Dry land coenopopulations]	0,222±0,03	0,192±0,02	0,137
Болотные ценопопуляции [Bog land coenopopulations]	0,211±0,03	0,192±0,02	0,093
Итого [Total]	0,232±0,02	0,192±0,01	0,170

Показатель генетической подразделённости всех изученных ценопопуляций (Gst) составил 0,170, а это означает, что основная доля полиморфизма ISSR-локусов (0,83) приходится на изменчивость внутри насаждений сосны обыкновенной. Сосредоточенность основной части генетического полиморфизма внутри популяций древесных видов также выявлена с использованием анализа аллозимов [5], ISSR-маркеров [9], SNPs [19] и ядерных микросателлитов [20]. Необходимо отметить, что установленная генетическая подразделённость географически близких болотных и суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной по ISSR-маркерам превышает уровень подразделённости, выявленный ранее с использованием такого же набора праймеров, для насаждений сосны обыкновенной, находящихся на расстоянии 150–600 км друг от друга (0,170 против 0,127) [21]. Данный вывод согласуется с результатами исследования роли экологических факторов в формировании генетической структуры популяций ели европейской, в ходе которых выявлен более высокий эффект экологической изоляции по сравнению с влиянием изоляции расстоянием [22].

Заключение

В результате сравнительных исследований болотных и суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной выявлены их высокое генетическое разнообразие и отличающаяся генетическая структура. Зависимость между уровнем генетической изменчивости ценопопуляций и почвенно-гидрологическими условиями не установлена, так как и среди болот и среди суходолов

встречались насаждения с относительно высокими и низкими значениями показателей генетического разнообразия. Важным результатом исследований является то, что выявлены статистически значимые различия по встречаемости ISSR-маркеров, полученных с пятью ISSR-праймерами из шести, у групп деревьев из суходольных и болотных ценопопуляций, произрастающих в одинаковых климатических условиях Республики Марий Эл. Кроме этого, дендрограмма, построенная на основе генетической дистанции Нея, и анализ главных компонентов показали, что все болотные ценопопуляции отнесены в одну изолированную от суходольных насаждений группу. Статистически значимые различия по встречаемости ISSR-локусов и отнесение всех болотных ценопопуляций в одну группу могут указывать на наличие репродуктивной изоляции между ценопопуляциями, сформированными в болотных и суходольных экотопах. На основе анализа молекулярной вариансы (AMOVA) можно утверждать, что общая генетическая изменчивость включает 9% генетического разнообразия, приходящегося на изменчивость между группами ценопопуляций, 13% изменчивости между ценопопуляциями внутри групп и 78% внутриценопопуляционного полиморфизма. Показатель генетической подразделённости всех ценопопуляций (Gst) составил 0,170, это указывает на то, что основная доля полиморфизма ISSR-маркеров (0,83) приходилась на изменчивость внутри ценопопуляций сосны обыкновенной.

Литература

1. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Ефремов С.П. Морфология пыльцы сосны обыкновенной на болотах и суходолах // Лесоведение. 2004. № 6. С. 58–75.
2. Пименов А.В., Седельникова Т.С. Качественная оценка формового разнообразия сосны обыкновенной в лесоболотных комплексах Западной Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30, № 1–2. С. 157–161.
3. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Ефремов С.П., Муратова Е.Н. Особенности генеративной сферы сосны обыкновенной болотных и суходольных популяций // Лесоведение. 2007. № 4. С. 44–50.
4. Седельникова Т.С., Муратова Е.Н., Пименов А.В. Экологическая обусловленность дифференциации кариотипов болотных и суходольных популяций видов *Pinaceae* // Ботанический журнал. 2010. Т. 95, № 11. С. 1543–1520.
5. Ларионова А. Я., Экарт А. К. Генетическое разнообразие и дифференциация болотных популяций сосны // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. 27, № 1–2. С. 120–126.
6. Петрова И.В., Санников С.Н., Черепанова О.Е. Репродуктивная изоляция и генетическая дифференциация суходольных и болотных популяций *Pinus sylvestris* L. Западной Сибири и Русской равнины // Сибирский лесной журнал. 2017. № 4. С. 28–37.
7. Petrova I.V., Sannikov S.N., Cherepanova O.E., Sannikova N.S. Reproductive isolation and disruptive selection as factors of genetic divergence between *Pinus sylvestris* L. populations // Russian Journal of Ecology. 2013. № 4. PP. 296–302. doi: 10.1134/S1067413613040103
8. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. Vol. 19. PP. 11–15.

9. Hui-yu L., Jing J., Gui-feng L., Xu-jun M., Jing-xiang D., Shi-jie L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers // Journal of Forest Research. 2005. Vol. 16 (3). PP. 216–218.
10. Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J., Ye Z., Xiyan J.M. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. 2000. URL: https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf (accessed 15.04.2019).
11. Nei M. Genetic distance between populations // The American Naturalist. 1972. Vol. 106 (949). PP. 283–292.
12. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam : North-Holland Publ. Co, 1975. 288 p.
13. Takezaki N., Nei M, Tamura K. POPTREEW: Web Version of POPTREE for Constructing Population Trees from Allele Frequency Data and Computing Some Other Quantities // Molecular Biology and Evolution. 2014. Vol. 31 (6). PP. 1622–1624. doi: 10.1093/molbev/msu093
14. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // Bioinformatics. 2012 Vol. 28 (19). PP. 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
15. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Paleontologia Electronica. 2001. Vol. 4 (1). PP. 1–9.
16. Vidyakin A.I., Boronnikovab S.V., Nechayeva Y.S., Pryshnivskaya Y.V., Boboshina I.V. 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 Genetic. 2015. Vol. 51 (12). PP. 1213–1220. doi: 10.1134/S1022795415120133
17. Boyle. T., Liengsiri C., Piewluang C. Genetic structure of black spruce on two contrasting sites // Heredity. 1990. Vol. 65. PP. 393–399.
18. O'reilly G.J., Parker W.H., Cheliak W.M. Isozyme differentiation of upland and lowland *Picea mariana* stands in northern Ontario // Silvae Genetica. 1985. Vol. 34. PP. 214–220.
19. Mosca E., Eckert A.J., Di Pierro E.A., Rocchini D., La Porta N., Belletti P., Neal D.B. The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps // Molecular Ecology. 2012. Vol. 21 (22). PP. 5530–5545. doi: 10.1111/mec.12043
20. Oreshkova N.V., Sedel'nikova T.S., Pimenov A.V., Efremov S.P. Analysis of genetic structure and differentiation of the bog and dry land populations of *Pinus sibirica* Du Tour based on nuclear microsatellite loci // Russian Journal of Genetic. 2014. Vol. 50 (9). PP. 934–941. doi: 10.1134/S1022795414090105
21. Криворотова Т.Н., Шейкина О.В. Генетическая структура лесосеменных плантаций и насаждений сосны обыкновенной в Среднем Поволжье // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. 2014. № 1 (21). С. 77–86.
22. Захарова К.В., Сейц К.С. Роль экологических факторов в формировании генетической структуры популяций *P. abies* (L.) Karst // Экологическая генетика. 2017. Т. 15, № 2. С. 11–20. doi: 10.17816/ecogen15211-20

Поступила в редакцию 27.05.2019 г.; повторно 06.11.2019 г.; принята 29.05.2020 г.; опубликована 19.06.2020 г.

Авторский коллектив:
Шейкина Ольга Викторовна – канд. с.-х. наук, доцент кафедры лесных культур, селекции и биотехнологии Поволжского государственного технологического университета (Россия, 424000, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, 3).

ORCID iD: https://orcid.org/0000-0002-7507-8588
E-mail: shejkinaov@volgatech.net
Гладков Юрий Федорович **–** начальник отдела защиты леса и государственного лесопатологического мониторинга Филиала ФБУ «Российский центр защиты леса» – «Центр защиты леса Республики Марий Эл» (Россия, 424000, г. Йошкар-Ола, ул. Комсомольская, 83).
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-6059-7601

Для цитирования: Шейкина О.В., Гладков Ю.Ф. Генетическое разнообразие и дифференциация ценопопуляций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), сформированных в болотных и суходольных экотопах // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 50. С. 101–118. doi: 10.17223/19988591/50/5

For citation: Sheikina OV, Gladkov YuF. Genetic diversity and differentiation of *Pinus sylvestris* L. coenopopulations growing in bog land and upland ecotopes. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology.* 2020;50:101-118. doi: 10.17223/19988591/50/5 In Russian, English Summary

Olga V. Sheikina[1], Yuriy F. Gladkov[2]

[1] *Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola, Russian Federation*
[2] *Branch of the Federal Budgetary Institution Russian Center for Forest Protection – Center for Forest Protection of the Republic of Mari El, Yoshkar-Ola, Russian Federation*

Genetic diversity and differentiation of *Pinus sylvestris* L. coenopopulations growing in bog land and upland ecotopes

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forming coenopopulations in diverse soil-hydrological conditions is of utmost interest in studying the environmental mechanisms of divergence among populations of tree species. The analysis of protein polymorphism educed the genetic differentiation between bog land and upland coenopopulations of Scots pine, emerging from phenological isolation. Thus, we find it essential to study further the mechanisms of developing the population structure of tree plants with the use of more meaningful methods of molecular genetic analysis that would allow identifying differences at the DNA level. The aim of the research is to study the indicators of genetic diversity and differentiation of coenopopulations of Scots pine growing in contrastive swamp and dry land conditions, using ISSR markers.

The polymerase chain reaction (PCR) method with ISSR primers was used to identify the level of genetic polymorphism and differentiation. DNA for analysis was isolated from the cambial layer of the trunk using the CTAB method. Four upland and three bog coenopopulations were studied in total (*See Table 1*). Within each coenopopulation, 30 trees were analyzed using $(CA)_6AGCT$, $(CA)_6AG$, $(CA)_6GT$, $(CA)_6AC$, $(AG)_8T$ and $(AG)_8GCT$ primers. We used the following reaction mixture (total volume of 10 µl) to amplify DNA with ISSR primers: 1 µl of PCR buffer; 0.2 µl 10 mM dNTPs; 0.1 µl of 100 µm primer; 1 µl of DNA sample; 0.1 µl of Taq polymerase (2 u / µl); 7.6 µl of water. PCR mode: 5 min. denaturation at 94 °C, 35 cycles: 0.5 min. denaturation at 94 ° C, 45 sec. annealing at 60 ° C, 45 sec elongation at 72 °C, final elongation for 7 min at 72 °C. The PCR results were visualized by electrophoresis in 1.5% agarose gel in TBE buffer. The results were recorded and data were processed using the GelDoc 2000 gel documentation system (Bio-Rad, USA) and the Quantity One® Version 4.6.3 software package. The date analysis was performed by the software tools POPGENE ver. 1.31., POPTREEW, GenAlEx and PAST 3.25.

We revealed that out of 215 ISSR-loci elicited in 240 trees out of eight coenopopulations 208 ISSR-loci were polymorphic. The number of elicited ISSR

loci in different coenopopulations varied from 162 to 194 (*See Table 2*). The studied coenopopulations were characterized by different levels of genetic diversity. Indicators of genetic diversity ranged within the following: the proportion of polymorphic loci was 67.9-88.5; the observed number of alleles was 1.679-1.805; effective number of alleles 1.279-1.331; the expected heterozygosity was 0.174-0.207. However, no dependency of genetic diversity indicators on soil-hydrological conditions has been found. Moreover, we considered that dry and bog coenopopulations differed significantly in the ISSR-markers frequency obtained with five of six ISSR-primers, which indicates a different genetic structure (*See Table 3*). Nei's genetic distance between different coenopopulations varied from 0.100 to 0.317. The UPGMA dendrogram and analysis of principal coordinates (PCoA) show that the bog forests make up a separate cluster (*See Fig. 1 and 2*). This may be a sign that there are genetic processes inducing the divergence of dry and bog coenopopulations of Scots pine. The Mantel test shows that genetic distance between populations had a weak positive correlation with geographic distance (R=0.3085, P=0.1728). Analysis of molecular variance (AMOVA) shows that 9% of total variation was accounted for by differences between groups of upland and bog land coenopopulations (*See Table 4*). The percentage of genetic variation among coenopopulations within compared groups was 13%. The majority of the variation was found within populations (78%). The overall level of genetic subdivision of coenopopulations was 17% (G_{ST}=0.17), hence, the main part of genetic variation is inside the coenopopulations (83%) (*See Table 5*). Thus, we showed a significant impact on the genetic structure formation of *P. sylvestris* population in this research.

The paper contains 5 Tables, 2 Figures and *22 References.*

Key words: *Pinus sylvestris* L.; ISSR-markers; intra- and intercoenopopulational variability; soil moisture.

Funding: The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, the research project No 13-04-00483, and the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the basic part of the national assignment for higher education institutions and research organizations in the field of scientific activities No 37.8531.2017.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Sedel'nikova TS, Pimenov AV, Efremov SP. Morfologiya pyl'tsy sosny obyknovennoy na bolotakh i sukhodolakh [Morphology of pollen in scots pine trees growing in bogs and dry valleys]. *Lesovedenie = Russian J Forest Science*. 2004;6:58-75. In Russian
2. Pimenov AV, Sedel'nikova TS. Kachestvennaya otsenka formovogo raznoobraziya sosny obyknovennoy v lesobolotnykh kompleksakh Zpradnoy Sibiri [Qualitative assessment of Scots pine shape diversity in the forest-bog complexes of Western Siberia]. *Khvoynye boreal'noy zony = Coniferous of the Boreal Area*. 2012;30(1-2):157-161. In Russian
3. Sedel'nikova TS, Pimenov AV, Efremov SP, Muratova EN. Osobennosti generativnoy sfery sosny obyknovennoy bolotnykh i sukhodol'nykh populyatsiy [Specific features of the generative sphere in scots pine of bog and dry valley populations]. *Lesovedenie = Russian J Forest Science*. 2007;4:44-50. In Russian
4. Sedel'nikova TS, Muratova EN, Pimenov AV. Ekologicheskaya obuslovlennost' differentsiatsii kariotipov bolotnykh i sukhodol'nykh populyatsiy vidov Pinaceae [Ecological determination of karyotypes differentation in bog and dry valley populations of *Pinaceae* species]. *Botanicheskiy Zhurnal = Botanical Journal*. 2010;95(11):1543-1520. In Russian

5. Larionova AY, Ekart AK. Geneticheskoe raznoobrazie i differentsiatsiya bolotnykh populyatsiy sosny [Genetic diversity and differentiation of swamp populations pine]. *Khvoynye boreal'noy zony = Coniferous of the Boreal Area*. 2010;27(1-2):120-126. In Russian
6. Petrova IV, Sannikov SN, Cherepanova OE. Reproductive isolation and genetic differentiation of dry land and bog populations of *Pinus sylvestris* L. in Western Siberia and Russian Plain. *Sibirskiy lesnoy zurnal = Siberian Journal of Forest Science*. 2017;4:28-37. doi: 10.15372/SJFS20170403 In Russian, English Summary
7. Petrova IV, Sannikov SN, Cherepanova OE, Sannikova NS. Reproductive isolation and disruptive selection as factors of genetic divergence between *Pinus sylvestris* L. populations. *Russian Journal of Ecology*. 2013;4:296-302. doi: 10.1134/S1067413613040103
8. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:11-15.
9. Hui-yu L, Jing J, Gui-feng L, Xu-jun M, Jing-xiang D, Shi-jie L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. *J Forest Research*. 2005;16(3):216-218.
10. Yeh FC, Yang R, Boyle TJ, Ye Z, Xiyan JM. POPGENE 32, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. 2000. Available at: https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf (accessed 15.04.2019)
11. Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist.* 1972;106(949):283-292.
12. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: North-Holland Publ. Co; 1975. 288 p.
13. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREEW: Web Version of POPTREE for Constructing Population Trees from Allele Frequency Data and Computing Some Other Quantities. *Molecular Biology and Evolution*. 2014;31(6):1622-1624. doi: 10.1093/molbev/msu093
14. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
15. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 2001;4(1):1-9.
16. Vidyakin AI, Boronnikova SV, Nechayeva YS, Pryshnivskaya YV, Boboshina IV. 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 Genetic*. 2015;51(12):1213-1220. doi: 10.1134/S1022795415120133
17. Boyle T, Liengsiri C, Piewluang C. Genetic structure of black spruce on two contrasting sites. *Heredity*. 1990;65:393-399.
18. O'reilly GJ, Parker WH, Cheliak WM. Isozyme differentiation of upland and lowland *Picea mariana* stands in northern Ontario. *Silvae Genetica*. 1985;34:214-220.
19. Mosca E, Eckert AJ, Di Pierro EA, Rocchini D, La Porta N, Belletti P, Neal DB. The geographical and environmental determinants of genetic diversity for four alpine conifers of the European Alps. *Molecular Ecology*. 2012;21(22):5530-5545. doi: 10.1111/mec.12043
20. Oreshkova NV, Sedel'nikova TS, Pimenov AV, Efremov SP. Analysis of genetic structure and differentiation of the bog and dry land populations of *Pinus sibirica Du Tour* based on nuclear microsatellite loci. *Russian Journal of Genetic*. 2014;50(9):934-941. doi: 10.1134/S1022795414090105
21. Krivorotova TN, Sheykina OV. Geneticheskaya struktura lesosemennykh plantatsiy i nasazhdeniy sosny obyknovennoy v Srednem Povolzh'e [Genetic structure of seed orchards and natural stands of *Pinus sylvestris* in the Middle Volga region]. *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Ser.: Les. Ekologiya.*

Prirodopol'zovanie = Vestnik of Volga State University of Technology. Series "Forest. Ecology. Nature Management". 2014;1(21):77-86. In Russian
22. Zakharova KV, Seyts KS. The role of environmental factors in the formation of the genetic structure of *P. abies* populations. *Ecological Genetics*. 2017;15(2):11-20. doi: 10.17816/ecogen15211-20 In Russian, English Summary

Received 27 May 2019; Revised 06 November 2019;
Accepted 29 May 2020; Published 19 June 2020.

Author info:
Sheikina Olga V, Cand. Sci. (Agric.), Assoc. Prof., Department of Forest Plantation, Selection and Biotechnology, Volga State University of Technology, 3 Lenina Sq., Yoshkar-Ola 424000, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0002-7507-8588
E-mail: shejkinaov@volgatech.net
Gladkov Yuriy F, Head of the Department of Forest Protection and State Forest Health Monitoring, Branch of the Federal Budgetary Institution Russian Office of Forest Protection, Office of Forest Protection in the Republic of Mari El, 83 Komsomolskaya Str., Yoshkar-Ola 424000, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-6059-7601
E-mail: dladkov-yuriy@yandex.ru