

Научная статья

УДК 630.1 (575.22)
DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.07

SSR-анализ плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Республики Марий Эл

Ольга Викторовна Шейкина¹
кандидат сельскохозяйственных наук

Евгений Михайлович Романов²
доктор сельскохозяйственных наук

Аннотация. Статья посвящена оценке генетического разнообразия генофонда плюсовых деревьев сосны обыкновенной с применением SSR-маркеров. Приведены данные об уровне генетического разнообразия и дифференциации выборок плюсовых деревьев, отобранных на свежих песчаных (A_2), влажных песчаных (A_3) и суглинистых почвах (C_2 и C_3). Всего у 71 плюсового дерева из Республики Марий Эл обнаружено 32 аллеля. Установлено, что частота встречаемости аллелей у локусов SPAG7.14, Psy157 и PtTX3107 достоверно различается у групп плюсовых деревьев, произрастающих на песчаных и суглинистых почвах. Это может указывать на различную генетическую структуру ценопопуляций, в которых были отобраны изученные генотипы (индивидуумы). Приведены значения основных показателей генетического разнообразия для пяти микросателлитных локусов, позволяющие сделать вывод о близком уровне разнообразия у сравниваемых групп плюсовых деревьев из разных почвенных условий. Все выборки плюсовых деревьев характеризуются относительно низким уровнем ожидаемой гетерозиготности ($H_o=0,35-0,37$) и существенным дефицитом гетерозигот ($F=0,48-0,49$). Анализ структуры генетической изменчивости на основе статистики Райта указывает на достаточно высокую генетическую дифференциацию выборок деревьев из разных почвенных условий. Выявлено, что 97,2 % всего генетического разнообразия приходится на внутригрупповую компоненту.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, плюсовые деревья, генетическое разнообразие, микросателлиты.

Для цитирования: Шейкина О.В., Романов Е.М. SSR-анализ плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Республики Марий Эл. – Текст : электронный // Лесохозяйственная информация. 2023. № 2. С. 91–101. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.07.

¹ Поволжский государственный технологический университет, доцент (Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, Российская Федерация), shejkinaov@volgatech.net

² Поволжский государственный технологический университет, профессор (Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, Российская Федерация), romanovem@volgatech.net

Original article

DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.07

SSR-Analysis of *Pinus sylvestris* Plus Trees from Mari El Republic

Olga V. Sheikina¹

Candidate of Agricultural Sciences

Evgeny M. Romanov²

Doctor of Agricultural Sciences

Abstract. The paper discusses the assessing issues of the genetic diversity of the *Pinus Sylvestris* plus gene pool with the use of the SSR markers. It gives the data on the level of genetic diversity and sample differentiation of plus trees grown on sandy (A_2), wet sandy (A_3), and clay-loam soils (C_2 u C_3). The author identified 32 alleles in total out of 71 plus trees from Mari El Republic. The author also elicits that the allele frequencies at the SPAG7.14, Psy157, and PtTX3107 loci differ significantly in the group of plus trees from sandy and clay-loam soils. Thus, reliable differences in the allele frequencies of plus trees specifies a diverse genetic structure of cenopopulations for the genotypes (individuals) under study. The paper gives the values of the main indicators of genetic diversity for five microsatellite loci, which allows for conclusion that the level of diversity in the compared groups of plus trees taken from different soil conditions is relatively close. A relatively low level of expected heterozygosis ($H_o = 0.35-0.37$) and a significant deficit of heterozygotes ($F = 0.48-0.49$) are typical for all samples of plus trees. An analysis of the genetic variability structure based on Wright statistics shows a rather high genetic subdivision of tree samples from different soil conditions. Finally, the paper concludes that 97.2 % of all genetic variability falls on the intragroup component.

Key words: *Pinus sylvestris* L., plus trees, genetic diversity, microsatellites.

For citation: Sheikina O., Romanov E. SSR-Analysis of *Pinus sylvestris* Plus Trees from Mari El Republic. – Text : electronic // Forestry information. 2023. № 2. P. 91–101. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2023.2.07.

¹Volga State University of Technology, Associate Professor (Yoshkar-Ola, Republic Mary El, Russian Federation), shejkinaov@volgatech.net

²Volga State University of Technology, Professor (Yoshkar-Ola, Republic Mary El, Russian Federation), romanovem@volgatech.net

Введение

При реализации селекционных программ необходимо сохранять генетическую изменчивость древесных растений, так как она обеспечивает популяциям возможность противостоять биотическим и абиотическим факторам в меняющихся климатических условиях [1]. Из-за длительности жизненного цикла процесс селекции у хвойных видов занимает достаточно большой период времени, поэтому важно уже на этапе отбора плюсовых деревьев проводить оценку их генетического разнообразия. Исследования генетического разнообразия клонов плюсовых деревьев, а также лесосеменных плантаций, созданных их потомством, зачастую демонстрируют противоречивые результаты. Существует мнение, что использование ограниченного количества плюсовых деревьев является основной причиной потери аллельного разнообразия [2]. Действительно, для ряда лесосеменных плантаций выявлено снижение числа аллелей у изоферментных и микросателлитных локусов по сравнению с естественными насаждениями [3–6]. Однако в других публикациях приводятся данные, показывающие, что отбор плюсовых деревьев не приводит к снижению генетического разнообразия [7–9].

Для решения разнообразных научных задач в области лесного селекционного семеноводства одним из наиболее востребованных типов молекулярных маркеров являются микросателлиты (или SSR-маркеры) [10]. Они представляют собой короткие tandemно повторяющиеся последовательности длиной 2–4 нуклеотида [11]. Большую востребованность данного типа ДНК-маркера обеспечивают такие преимущества, как высокий полиморфизм, кодоминантный тип наследования, высокая частота встречаемости в геноме и воспроизводимость метода [12]. Для изучения ядерных микросателлитных локусов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) разработаны и протестированы специфические праймеры [13–15].

На сегодняшний день в Республике Марий Эл числится 192 плюсовых дерева сосны

обыкновенной. Плюсовые деревья отобраны в контрастных почвенно-экологических условиях – от песков до суглинков. В рамках организации лесного семеноводства на принципах плюсовой селекции на территории Сернурского лесничества с 1994 по 1997 г. созданы следующие объекты лесного семеноводства сосны обыкновенной: маточная плантация на площади 6 га, 2 клоновые лесосеменные плантации 1-го порядка на общей площади 51 га и испытательные культуры плюсовых деревьев на площади 0,5 га. Однако до настоящего времени работы по изучению генетического разнообразия данных объектов с использованием микросателлитов не проводили.

Цель исследования – изучение генетического разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной в разных типах лесорастительных условий (ТЛУ) на основе анализа ядерных микросателлитных локусов.

Объект и методы исследования

Объекты исследования – клоны плюсовых деревьев сосны обыкновенной, произрастающие на маточной плантации (коллекционно-маточном участке) Сернурского лесничества Республики Марий Эл. Маточная плантация заложена в 1994 г. посадкой привитых саженцев с размещением 5×5 м. Саженцы для создания плантации получены путем прививки способом «в приклад сердцевинной на камбий». Для оценки генетического разнообразия плюсовых деревьев заготовлены образцы с 71 клона, из которых 24 являются вегетативным потомством плюсовых деревьев, отобранных в ТЛУ А₂ (свежая песчаная почва), 33 клона – в ТЛУ А₃ (влажная песчаная почва) и 14 клонов – в ТЛУ С₂ и С₃ (свежие и влажные суглинистые почвы).

ДНК для генетического анализа выделена из камбиального слоя СТАВ-методом [16]. Генетический анализ клонов плюсовых деревьев выполнен по 5 микросателлитным локусам: SPAG7.14 [13], Psy117 и Psy157 [14], PtTX2146 и PtTX3107 [15] (табл. 1).

Таблица 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ ПРАЙМЕРОВ И РЕЗУЛЬТАТЫ ПЦР

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРАЙМЕРОВ		РЕЗУЛЬТАТЫ ПЦР	
Локус	Последовательность праймеров	Число аллелей	Длина аллелей, п.н.
SPAG7.14	F: TTCGTAGGACTAAAAATGTGTG R: CAAAGTGGATTTTGACCG	8	180–250
Psy117	F: TGGTCTGCAAATCAATCGAA R: GGGTAGGAATGCAAGTTAGGC	5	221–251
Psy157	F: CCCCACATCTTACAGTCCAA R: TGCTCTGGATTTGTTGCTG	4	155–205
PtTX2146	F: CCTGGGGATTGGATTGGGTATTG R: ATATTTCTTGCCTTCCAGACA	9	178–243
PtTX3107	F: AAACAAGCCACATCGTCAATC R: TCCCCTGGATCTGAGGA	7	146–161

Для амплификации микросателлитных локусов использовали следующий режим: предварительная денатурация при 94 °С в течение 15 мин; 35 циклов – денатурация при 94 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при 56 °С для локусов Psy117 и PtTX2146, при 58 °С для локуса PtTX3107 и 60 °С для локусов SPAG7.14 и Psy157 в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 30 с; окончательная элонгация при 72 °С в течение 10 мин и охлаждение до 4 °С в течение 10 мин. ПЦР проводили в приборе CFX96 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с использованием коммерческого набора Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия). Использован следующий состав реакционной смеси для амплификации микросателлитных локусов общим объемом 15 мкл: буфер – 1,5 мкл, dNTPs – 0,3 мкл, Tag-полимераза – 0,3 мкл, прямой и обратный праймеры – по 0,5 мкл, стерильная вода – 10,9 мкл и матричная ДНК – 1 мкл.

Визуализация продуктов амплификации проведена в буфере TBE путем вертикального электрофореза в 6,0 %-м полиакриламидном геле. Фиксация результатов электрофореза и определение длин аллелей микросателлитных локусов выполнены с использованием системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США) и программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. Расчет показателей генетического разнообразия и показателей F-статистики Райта сделаны в программе GenAlEX6 [17].

Результаты и обсуждение

Из 71 клона плюсовых деревьев у 5-ти локусов обнаружено всего 32 аллеля (см. табл. 1). Наибольшее аллельное разнообразие наблюдается в локусах SPAG7.14 (8 шт.) и PtTX2146 (9 шт.). Наименьшее число аллелей установлено для локуса Psy157 (4 шт.). Для сравнения: при тестировании праймеров на 150 деревьях из 5-ти насаждений в Красноярском крае число выявленных аллелей составило: 13 – для локуса SPAG7.14, 9 – для локуса Psy117, 6 – для локуса Psy157, 11 – для локуса PtTX2146 и 8 – для локуса PtTX3107 [18]. В целом количество аллелей у одних и тех же локусов может варьировать в зависимости от размера выборки и района исследования. Например, в Республике Карелии на лесосеменной плантации и в разных насаждениях сосны обыкновенной у локуса PtTX2146 обнаружено от 5 до 10 аллелей [5, 19], у 150 деревьев из Красноярского края – 11 [18], у 28 клонов в Швеции – 15 [20], а у 60 деревьев из двух насаждений Республики Марий Эл – 12 аллелей [21].

Для оценки достоверности различий между рядами распределения частот встречаемости аллелей выполнен χ^2 -тест (табл. 2). Установлены статистически значимые различия частот встречаемости аллелей у плюсовых деревьев, отобранных на песчаных почвах (A_2 и A_3), и группы деревьев, произрастающих на суглинистых почвах (C_2 и C_3), для локусов SPAG7.14 ($\chi^2_{\text{расч.}} = 24,90$

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНЕНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ В ГРУППАХ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ ИЗ РАЗНЫХ ТИПОВ ЛЕСОРАСТИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИТЕРИЯ χ^2

Локус	ЗНАЧЕНИЕ $\chi^2_{\text{табл.}}$ ПРИ $P=0,01$	ЗНАЧЕНИЯ $\chi^2_{\text{расч.}}$ ДЛЯ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП ДЕРЕВЬЕВ В ТЛУ		
		A_2 и A_3	A_2, C_2 и C_3	A_3, C_2 и C_3
SPAG7.14	18,48	10,09	24,90	32,58
Psy117	13,28	7,13	10,55	4,21
Psy157	11,30	13,91	14,15	85,09
PtTX2146	20,09	17,11	18,78	17,52
PtTX3107	15,09	16,10	62,02	27,97

и 32,58, $\chi^2_{\text{табл.}} = 18,48$), Psy157 ($\chi^2_{\text{расч.}} = 14,15$ и 85,09, $\chi^2_{\text{табл.}} = 11,30$) и PtTX3107 ($\chi^2_{\text{расч.}} = 62,02$ и 27,97, $\chi^2_{\text{табл.}} = 15,09$). Также установлено, что группы деревьев из ТЛУ A_2 и A_3 имеют существенные различия в частотах встречаемости аллелей у локусов Psy157 ($\chi^2_{\text{расч.}} = 13,91$, $\chi^2_{\text{табл.}} = 11,30$) и PtTX3107 ($\chi^2_{\text{расч.}} = 16,10$, $\chi^2_{\text{табл.}} = 15,09$). Однако различия статистически значимы не для всех сравниваемых рядов распределения частот встречаемости аллелей. Так, для локусов Psy117 и PtTX2146 не установлено статистически значимых различий в частотах встречаемости аллелей у групп деревьев из разных типов лесорастительных условий, так как во всех случаях расчетный критерий χ^2 оказался меньше табличного значения. Кроме того, достоверно не различались частоты аллелей у деревьев из ТЛУ A_2 и A_3 у локуса SPAG7.14 ($\chi^2_{\text{расч.}} = 10,09$, $\chi^2_{\text{табл.}} = 18,48$). Выявленные различия в частотах встречаемости отобранных плюсовых деревьев могут указывать на существование отличий в генетической структуре ценопопуляций, формируемых в разных почвенно-экологических условиях. Такие различия могут быть обусловлены разнонаправленным действием отбора в отличающихся почвенно-эдафических условиях. В то же время различия в частотах встречаемости в нашем исследовании могут быть обусловлены дрейфом генов, т.е. изменением частот аллелей под воздействием существенного сокращения выборки плюсовых деревьев. На наш взгляд, этот вопрос требует дальнейших исследований.

Расчет генетической дистанции Нея показал, что наиболее дифференцированными являются

группы плюсовых деревьев, произрастающих на влажных песках (A_3) и суглинистых почвах (C_2 и C_3), у которых генетическая дистанция составила 0,137. Наименее генетически дифференцированными оказались выборки плюсовых деревьев из ТЛУ A_2 и A_3 ($D_N = 0,37$).

Сравнительный анализ значений показателей генетического разнообразия выявил некоторые различия для групп деревьев из разных типов лесорастительных условий (табл. 3). Так, наивысшие значения наблюдаемой гетерозиготности были у локуса PtTX2146 для плюсовых деревьев, произрастающих на песчаных почвах (0,75 для A_2 и 0,88 для A_3), в то время как для деревьев на суглинистых почвах наблюдаемая гетерозиготность данного локуса составила 0,43. Различия по уровню наблюдаемой гетерозиготности также установлены для локуса SPAG7.14, значения которого варьировали в разных группах плюсовых деревьев от 0,27 до 0,57. В то же время для локуса Psy117 у всех сравниваемых групп деревьев установлены самые низкие значения наблюдаемой гетерозиготности (0,13–0,15). В целом, по разным литературным данным, наблюдаемая гетерозиготность отдельных микросателлитных локусов сосны обыкновенной может варьировать от 0,152 до 0,857 [20–22]. Нужно отметить, что для локусов Psy117 и PtTX3107 у изученных групп плюсовых деревьев определены более низкие значения наблюдаемой гетерозиготности по сравнению с ранее установленными значениями для болотной и суходольной ценопопуляций в том же регионе исследования (0,13–0,15 против 0,50–0,63

Таблица 3. Показатели генетического разнообразия клонов плюсовых деревьев, отобранных в разных типах лесорастительных условий

Локус	Число аллелей на локус, N_A	Эффективное число аллелей, N_E	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта, F
			наблюдаемая, H_o	ожидаемая, H_e	
ТЛУ A_2					
SPAG7.14	7	4,61	0,42	0,78	0,47
Psy117	5	2,30	0,13	0,57	0,78
Psy157	3	2,23	0,25	0,55	0,55
PtTX2146	9	3,77	0,75	0,73	-0,02
PtTX3107	5	3,48	0,25	0,71	0,65
ТЛУ A_3					
SPAG7.14	8	4,08	0,27	0,77	0,64
Psy117	5	2,87	0,15	0,65	0,77
Psy157	4	1,78	0,15	0,44	0,65
PtTX2146	8	4,54	0,88	0,78	-0,13
PtTX3107	6	3,29	0,33	0,69	0,52
ТЛУ C_2 и C_3					
SPAG7.14	8	4,67	0,57	0,79	0,27
Psy117	5	2,65	0,14	0,62	0,77
Psy157	3	2,29	0,21	0,56	0,62
PtTX2146	6	3,29	0,43	0,69	0,39
PtTX3107	7	5,16	0,50	0,81	0,38

для локуса Psy117; 0,25–0,50 против 0,57–0,67 для локуса PtTX3107) [21].

У большинства изученных локусов всех групп деревьев наблюдается существенный дефицит гетерозигот, о чем свидетельствуют положительные значения индекса фиксации Райта. Наибольший дефицит гетерозигот наблюдается у локусов Psy117 и Psy157, у которых индекс фиксации Райта достигает для разных групп плюсовых деревьев 0,55–0,78. Только у локуса PtTX2146 для плюсовых деревьев, отобранных на песчаных почвах (ТЛУ A_2 и A_3), установлен незначительный избыток гетерозигот ($F = -0,02$ и $-0,13$). Ранее в Республике Марий Эл при изучении болотных и суходольных ценопопуляций сосны обыкновенной также был выявлен небольшой избыток гетерозигот у локуса PtTX2146 ($F = -0,04$ и $-0,01$) и дефицит у локусов PtTX2146 и Psy117 ($F = 0,09$ – $0,33$) [21].

Сравнение показателей генетического разнообразия, рассчитанных для всех

микросателлитных локусов, показало, что группы плюсовых деревьев из разных типов лесорастительных условий характеризовались близким уровнем полиморфизма SSR-маркеров. Число аллелей на локус варьировало от 5,80 до 6,20 в сравниваемых группах плюсовых деревьев, эффективное число аллелей – от 3,31 до 3,46, наблюдаемая гетерозиготность – от 0,35 до 0,37, ожидаемая гетерозиготность – от 0,66 до 0,69, индекс фиксации Райта – от 0,48 до 0,49 (табл. 4). В целом для 71 клона плюсовых деревьев сосны обыкновенной, включенных в анализ микросателлитных локусов, установлены следующие значения показателей генетического разнообразия: число аллелей на локус – 6,20, эффективное число аллелей – 3,46, наблюдаемая гетерозиготность – 0,35, ожидаемая гетерозиготность – 0,68, индекс фиксации Райта – 0,51. Необходимо отметить, что исследованные плюсовые деревья характеризуются более низким уровнем наблюдаемой гетерозиготности ($H_o = 0,35$) по сравнению

Таблица 4. Показатели генетического разнообразия клонов плюсовых деревьев для всех микросателлитных локусов

ТЛУ	Число аллелей на локус, N_A	Эффективное число аллелей, N_E	Гетерозиготность		Индекс фиксации Райта, F
			наблюдаемая, H_o	ожидаемая, H_e	
A_3	6,20±0,89	3,31±0,48	0,36±0,14	0,66±0,06	0,49±0,16
A_2	5,80±1,02	3,28±0,45	0,36±0,11	0,67±0,05	0,48±0,14
C_2 и C_3	5,80±0,86	3,61±0,56	0,37±0,08	0,69±0,05	0,49±0,09
Для всех ТЛУ	6,20±0,93	3,46±0,47	0,35±0,11	0,68±0,05	0,51±0,13

с изученными в том же регионе насаждениями сосны обыкновенной с использованием другого набора 5-ти микросателлитных локусов [21]. В целом среднее значение наблюдаемой гетерозиготности при анализе различных комбинаций ядерных микросателлитов для отдельных насаждений и лесосеменных плантаций может варьировать от 0,280 до 0,675 [5, 18, 19, 21].

Анализ структуры генетического разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной из разных типов лесорастительных условий с помощью статистики Райта выявил дефицит гетерозигот для всех локусов как на популяционном ($F_{IS} = 0,069-0,772$), так и на видовом уровне ($F_{IT} = 0,083-0,774$) (табл. 5). В среднем каждое плюсовое дерево в выборке имеет 48,2 %-й дефицит гетерозигот относительно популяции ($F_{IS} = 0,482$) и 49,6 %-й дефицит гетерозигот относительно вида ($F_{IT} = 0,496$). Всего 2,8 % изменчивости приходится на межпопуляционную (в нашем исследовании межгрупповую) компоненту

($F_{ST} = 0,028$). Наибольшая доля генетического разнообразия сосредоточена внутри сравниваемых групп плюсовых деревьев из разных типов лесорастительных условий (97,2 %). Наибольший вклад в дифференциацию групп плюсовых деревьев из разных типов лесорастительных условий внес локус Psy157 ($F_{ST} = 0,063$).

Выводы

На основе анализа 5-ти ядерных микросателлитных локусов (SSR-маркеров) получены качественно новые данные об уровне генетической дифференциации и разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной, отобранных в разных типах лесорастительных условий на территории Республики Марий Эл. У 5-ти микросателлитных локусов выявлено всего 32 аллеля. В сравниваемых группах плюсовых деревьев обнаружены статистически достоверные различия

Таблица 5. Показатели F-статистики Райта для групп плюсовых деревьев сосны обыкновенной из разных типов условий местопроизрастания

Локус	Индекс фиксации		
	особи относительно популяции, F_{IS}	особи относительно вида, F_{IT}	популяции относительно вида, F_{ST}
SPAG7.14	0,457	0,467	0,018
Psy117	0,772	0,774	0,008
Psy157	0,603	0,628	0,063
PtTX2146	0,069	0,083	0,015
PtTX3107	0,511	0,529	0,037
Для всех локусов	0,482±0,116	0,496±0,116	0,028±0,010

в частотах встречаемости аллелей у 3-х локусов из 5-ти (SPAG7.14, Psy157 и PtTX3107). Полученные данные свидетельствуют о том, что почвенно-экологические условия могут оказывать влияние на генетическую структуру ценопопуляций, поэтому фактор происхождения плюсовых деревьев необходимо учитывать при реализации программ по селекционному семеноводству сосны обыкновенной на принципах плюсовой селекции. Для решения данного вопроса необходимо провести обследования ценопопуляций, в которых были

отобраны плюсовые деревья. По показателям генетического разнообразия изученные выборки плюсовых деревьев из разных почвенных условий не различались. Основная доля выявленного генетического разнообразия находится внутри групп плюсовых деревьев из разных типов лесорастительных условий (97,2 %). В целом данные по изученным плюсовым деревьям по сравнению с литературными сведениями характеризуются сопоставимым аллельным разнообразием, но относительно низким уровнем гетерозиготности.

*Работа выполнена при поддержке
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
(Грант № 075-15-2021-674) и Центра коллективного пользования
«Экология, биотехнологии и процессы получения
экологически чистых энергоносителей»
Поволжского государственного технологического университета,
Йошкар-Ола*

Список источников

1. Porth, I. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers / I. Porth, Y.A. El-Kassaby // Diversity. – 2014. – № 6. – P. 283–295.
2. Stoehr, M.U. Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia / M.U. Stoehr, Y.A. El-Kassaby // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – № 94. – P. 83–90.
3. Шигапов, З.Х. Сравнительный генетический анализ лесосеменных плантаций и природных популяций сосны обыкновенной / З.Х. Шигапов // Лесоведение. – 1995. – № 3. – С. 19–24.
4. Селекционная и генетическая оценка лесосеменных плантаций дуба черешчатого ГЛХУ «Кличевский лесхоз» / А.И. Сидор, И.Д. Ревяко, Д.И. Каган, О.А. Ковалевич, О.В. Селих // Труды БГТУ. – 2014. – № 1. – С. 181–184.
5. Ильинов, А.А. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновенной и ели финской в Карелии / А.А. Ильинов, Б.В. Раевский // Экологическая генетика. – 2015. – Т. XIII. – № 4. – С. 55–67.
6. Cheliak, W.M. Genetic effects of phenotypic selection in white spruce / W.M. Cheliak, G. Murray, J.A. Pitel // Forest Ecology and Management. – 1988. – Vol. 24. – № 2. – P. 139–149.
7. Bergman, F. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations / F. Bergman, W. Ruetz // Forest Ecology and Management. – 1991. – Vol. 46. – № 1–2. – P. 39–47.
8. Chaisurisri, K. Genetic diversity in a seed production population and natural population of Sitka spruce / K. Chaisurisri, Y.A. El-Kassaby // Biodiversity & Conservation. – 1994. – Vol. 3. – № 6. – P. 512–523.
9. Криворотова, Т.Н. Генетическая структура лесосеменных плантаций и насаждений сосны обыкновенной в Среднем Поволжье / Т.Н. Криворотова, О.В. Шейкина // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 1(21). – С. 77–86.
10. Шейкина, О.В. Применение молекулярных маркеров в лесном селекционном семеноводстве в России: опыт и перспективы (обзор) / О.В. Шейкина // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер: Лес. Экология. Природопользование. – 2022. – № 2 (54). – С. 64–79.
11. Tautz, D. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes / D. Tautz, M. Renz // Nucleic acids research. – 1984. – № 12. – P. 4127–4138.
12. Mondini, L. Assessing plant genetic diversity by molecular tools / L. Mondini, A. Noorani, M.A. Pagnott // Diversity. – 2009. – № 1. – P. 19–35.
13. Soranzo, N. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // Molecular Ecology. – 1998. – № 7. – P. 1247–1263.
14. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* / F. Sebastiani, F. Pinzauti, S.T. Kujala, S.C. Gonzalez-Martinez, G.G. Vendramin // Conservation Genetics Resources. – 2012. – № 4. – P. 231–234.
15. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs / Ch. Liewlaksaneeyanawin, C.E. Ritland, Y.A. El-Kassaby, K. Ritland // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – № 109. – P. 361–369.
16. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochemical Bulletin. – 1987. – № 19. – P. 11–15.
17. Peakall, R. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – № 6. – P. 288–295.
18. Разработка панели ядерных микросателлитных локусов для оценки легальности происхождения древесины сосны обыкновенной в Красноярском крае / Д.Н. Шуваев, А.А. Ибе, Ю.Е. Щерба, Т.В. Сухих, Е.А. Шилкина, Е.А. Усова, Е.В. Лисотова, М.В. Репях, О.М. Ступакова // Хвойные boreальной зоны. – 2020. – Т. XXXVIII. – № 5–6. – С. 297–304.

19. Ильинов, А.А. Состояние генофонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии / А.А. Ильинов, Б.В. Раевский // Сибирский лесной журнал. – 2016. – № 5. – С. 45–54.
20. Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard / T. Torimaru, X.-R. Wang, A. Fries, B. Andersson, D. Lindgren // *Silvae Genetica*. – 2009. – Vol. 58. – № 5/6. – P. 262–269.
21. Гладков, Ю.Ф. Генетический полиморфизм деревьев сосны обыкновенной из смежных болотной и сухоходольной ценопопуляций по ядерным микросателлитным локусам / Ю.Ф. Гладков, О.В. Шейкина // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2019. – № 4 (44). – С. 70–79.
22. Kuchma, O. Mutation rates in Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers / O. Kuchma, B. Vornam, R. Finkeldey // *Mutation Research*. – 2011. – № 725. – P. 29–35.

References

1. Porth, I. Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers / I. Porth, Y.A. El-Kassaby // *Diversity*. – 2014. – № 6. – P. 283–295.
2. Stoehr, M.U. Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia / M.U. Stoehr, Y.A. El-Kassaby // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – № 94. – R. 83–90.
3. Shigapov, Z.H. Sravnitel'nyj geneticheskij analiz lesosemennyh plantacij i prirodnyh populyacij sosny obyknovennoj / Z.H. Shigapov // *Lesovedenie*. – 1995. – № 3. – S. 19–24.
4. Selekcionnaya i geneticheskaya ocenka lesosemennyh plantacij duba chereschatogo GLHU «Klichevskij leskhoz» / A.I. Sidor, I.D. Revyako, D.I. Kagan, O.A. Kovalevich, O.V. Selih // *Trudy BGTU*. – 2014. – № 1. – S. 181–184.
5. Il'inov, A.A. Sravnitel'naya ocenka geneticheskogo raznoobraziya estestvennyh populyacij i klonovyh plantacij sosny obyknovennoj i eli finskoj v Karelii / A.A. Il'inov, B.V. Raevskij // *Ekologicheskaya genetika*. – 2015. – T. XIII. – № 4. – S. 55–67.
6. Cheliak, W.M. Genetic effects of phenotypic selection in white spruce / W.M. Cheliak, G. Murray, J.A. Pitel // *Forest Ecology and Management*. – 1988. – Vol. 24. – № 2. – R. 139–149.
7. Bergman, F. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations / F. Bergman, W. Ruetz // *Forest Ecology and Management*. – 1991. – Vol. 46. – № 1–2. – R. 39–47.
8. Chaisurisri, K. Genetic diversity in a seed production population and natural population of Sitka spruce / K. Chaisurisri, Y.A. El-Kassaby // *Biodiversity & Conservation*. – 1994. – Vol. 3. – № 6. – R. 512–523.
9. Krivorotova, T.N. Geneticheskaya struktura lesosemennyh plantacij i nasazhdenij sosny obyknovennoj v Srednem Povolzh'e / T.N. Krivorotova, O.V. Shejkina // *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta*. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopol'zovanie. – 2014. – № 1(21). – S. 77–86.
10. Shejkina, O.V. Primenenie molekulyarnyh markerov v lesnom selekcionnom semenovodstve v Rossii: opyt i perspektivy (obzor) / O.V. Shejkina // *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta*. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopol'zovanie. – 2022. – № 2 (54). – S. 64–79.
11. Tautz, D. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes / D. Tautz, M. Renz // *Nucleic acids research*. – 1984. – № 12. – P. 4127–4138.
12. Mondini, L. Assessing plant genetic diversity by molecular tools / L. Mondini, A. Noorani, M.A. Pagnott // *Diversity*. – 2009. – № 1. – P. 19–35.
13. Soranzo, N. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // *Molecular Ecology*. – 1998. – № 7. – P. 1247–1263.

14. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* / F. Sebastiani, F. Pinzauti, S.T. Kujala, S.C. Gonzalez-Martinez, G.G. Vendramin // Conservation Genetics Resources. – 2012. – № 4. – P. 231–234.
15. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs / Ch. Liewlaksaneeyanawin, C.E. Ritland, Y.A. El-Kassaby, K. Ritland // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – № 109. – R. 361–369.
16. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochemical Bulletin. – 1987. – № 19. – R. 11–15.
17. Peakall, R. GenAEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – № 6. – R. 288–295.
18. Razrabotka paneli yadernyh mikrosatellitnyh lokusov dlya ocenki legal'nosti proiskhozhdeniya drevesiny sosny obyknovnoy v Krasnoyarskom krae / D.N. Shuvaev, A.A. Ibe, Yu.E. Shcherba, T.V. Suhih, E.A. Shilkina, E.A. Usova, E.V. Lisotova, M.V. Repyah, O.M. Stupakova // Hvojnye boreal'noj zony. – 2020. – T. XXXVIII. – № 5–6. – S. 297–304.
19. Il'inov, A.A. Sostoyanie genofonda sosny obyknovnoy *Pinus sylvestris* L. v Karelii / A.A. Il'inov, B.V. Raevkij // Sibirskij lesnoj zhurnal. – 2016. – № 5. – S. 45–54.
20. Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard / T. Torimaru, X.-R. Wang, A. Fries, B. Andersson, D. Lindgren // Silvae Genetica. – 2009. – Vol. 58. – № 5/6. – P. 262–269.
21. Gladkov, YU.F. Geneticheskij polimorfizm derev'ev sosny obyknovnoy iz smezhnyh bolotnoj i suhodol'noj cenopopulyacij po yadernym mikrosatellitnym lokusam / Yu.F. Gladkov, O.V. Shejkina // Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopol'zovanie. – 2019. – № 4 (44). – S. 70–79.
22. Kuchma, O. Mutation rates in Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers / O. Kuchma, B. Vornam, R. Finkeldey // Mutation Research. – 2011. – № 725. – P. 29–35.