

УДК 582.475:581.9+575(470.56)

Молекулярно-генетические исследования популяций *Pinus sylvestris* L. на примере Восточно-Европейской равнины и южной окраины Уральской горной страны

М. В. Рябухина^{1*}, Р. Г. Калякина², Н. В. Фризен^{3,4}

¹ Федеральный научный центр Биологических систем и агротехнологий Российской академии наук,
ул. 9 Января, 29, г. Оренбург, 460014, Россия. *E-mail: marija-rjabuhina@mail.ru

² Оренбургский государственный аграрный университет, ул. Челюскинцев, 18, г. Оренбург, 460014, Россия.
E-mail: kalyakina_railya@mail.ru

³ Ботанический сад Университета Оснабрюк, Альбрехтштрассе, 29, г. Оснабрюк, 490776, Германия.
E-mail: friesen@biologie.uni-osnabrueck.de

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова,
Измайловский бульвар, 8, г. Москва, 105043, Россия

* Автор для переписки

Ключевые слова: естественное восстановление леса, подрост, полиморфный локус, реликтовый древостой, сосна обыкновенная, ISSR-анализ.

Аннотация. Методом ISSR-анализа изучена генетическая принадлежность подроста *Pinus sylvestris* L. в реликтовых островных борах, занимающих пограничное положение с культурными насаждениями *P. sylvestris*. В ходе исследования установлено, что для островных боров Бузулукского, Бугурусланского и Адамовского р-нов Оренбургской области характерен высокий уровень генетического разнообразия. Согласно анализу главных компонент, выборки реликтовых сосен и подроста делятся на 2 группы, одна из которых (группа А) присутствует во всех изучаемых районах, другая (группа В) – только на территории Адамовского р-на. Группа А отличается высоким генетическим разнообразием и состоит из трех генетических кластеров. Обособленное положение выборки Адамовского р-на и перекрываемое положение популяций Бузулукского и Бугурусланского р-нов, предположительно, обусловлено разностью ботанико-географических зон и почвенно-экологическими условиями. Кластерный анализ (UPGMA), основанный на степени сходства популяций по ISSR-маркерным признакам, а также определение генетической дистанции при помощи программы Mega 7.0, выявило, что в Бузулукском и Бугурусланском р-нах подрост генетически близок реликтовому древостою. Исследование последовательности отдельных фрагментов ДНК не выявило филогенетических связей между подростом и реликтовым древостоем в Адамовском р-не, что может свидетельствовать об отсутствии перекрестного опыления реликтового древостоя с культурным.

Molecular genetic studies of the natural self-renewal of *Pinus sylvestris* L. populations on the example of the East European Plain and the southern outskirts of the Ural mountain country

M. V. Rjabuchina¹, R. G. Kalyakina², N. Friesen^{3,4}

¹ Federal Scientific center of Biological systems and agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences,
str. January 9, 29, Orenburg, 460014, Russian Federation

² Orenburg state agrarian University, Chelyuskintsev str., 18, Orenburg, 460014, Russian Federation

³ Botanical Garden of the University of Osnabrueck, Albrechtstrasse, 29, 490776, Osnabrück, Germany

⁴ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation, Izmailovsky Boulevard, 8, Moscow, 105043, Russian Federation

Keywords: ISSR-analysis, natural forest restoration, polymorphic locus, relic forest stand, Scots pine, undergrowth.

Summary. Using the method of ISSR analysis, the genetic affiliation of *Pinus sylvestris* L. undergrowth was studied in relic island forests that occupy a borderline position with *P. sylvestris* cultivated plants. The study found that the island burs of the Buzuluk, Buguruslan and Adamovsky districts of the Orenburg Region are characterized by a high level of genetic diversity. According to the analysis of the main components of the sample of relic pines and undergrowth, they are divided into 2 groups, one of which (group A) is present in all the studied areas, the other (group B) – only in the Adamovsky district. Group A is characterized by high genetic diversity and consists of three genetic clusters. The isolated position of the sampling of the Adamovsky district and the overlapping position of the populations of the Buzuluk and Buguruslan districts are presumably due to the difference in botanical and geographical zones and soil and environmental conditions. Cluster analysis (UPGMA), based on the degree of similarity of populations by ISSR-marker characteristics, as well as determination of genetic distance using the Mega 7.0 program, revealed that in the Buzuluk and Buguruslan districts the undergrowth is genetically close to relic forest stands. Presumably, there is no cross-pollination of the relic stand with the cultivated one due to the mismatch in the phenological dates of pine dusting. As a result of the study of the sequence of individual DNA fragments, phylogenetic relationships were not established between the undergrowth and relic forest stand in the Adamovsky district.

Введение

Территория Оренбургской области, согласно физико-географическому районированию, расположена на Восточно-Европейской равнине и южной окраине Уральской горной страны и относится к степной и лесостепной зонам (Chibilyov A. A., Chibilyov Ant. A., 2012). Лесистость территорий исследования незначительна и составляет порядка 5 %. Лесопокрытые участки распространены неравномерно и в основном приурочены к поймам рек и их песчаным террасам, холмистым междуречьям и склонам, выходам разрушающихся скальных пород (Kurnaev, 1973). Реликтовые популяции *Pinus sylvestris* L. – сосны обыкновенной – на территории Оренбургской области сохранились в качестве островных боров (Gurskiy et al., 2003; Ryabinina, 1998; Chibilyov A. A., Chibilyov Ant. A., 2012; Chibilyov, 2015). В настоящее время в районах исследования отмечается уменьшение площади реликтового хвойного леса, который в значительной степени подвержен антропогенному воздействию и степным пожарам (Kalyakina et al., 2018).

Большая часть деревьев реликтовых популяций относится к сенильной возрастной категории, и их количество ежегодно уменьшается. В связи с этим актуален вопрос о возможности естественного возобновления реликтовых попу-

ляций, которые обладают высоким адаптивным потенциалом и устойчивы к эколого-климатическим условиям Восточно-Европейской равнины и южной окраины Уральской горной страны.

На территории Оренбургской области леса имеют высокое эколого-биологическое значение, в связи с этим, начиная со второй половины XX века, активно развивалось лесоразведение. При этом для посадки сосны обыкновенной использовался семенной материал из других регионов. В частности, согласно архивным данным Министерства лесного и охотничьего хозяйства Оренбургской области, для создания гослесополосы «Гора Вишневая-Каспийское море» семена сосны обыкновенной завозились из Республики Хакасии (Gurskiy et al., 2005). Опыт использования для лесомелиорации нерайонированного, генетически чуждого посадочного материала показал низкую эффективность данного мероприятия. В настоящее время произошло выпадение большей части искусственных насаждений по причине низкой устойчивости к факторам среды. Изменение генетической структуры лесных популяций (Prishnivskaya et al., 2016) неминуемо приводит к снижению адаптивных реакций, проявляющихся филогенетически, а также уменьшению действующих районов формообразования (Goncharenko et al., 1991).

На сегодняшний день вопрос лесовосстановления на территории Оренбургской области

весьма актуален. Площади высаживаемых лесных культур превышают площади погибших, что приводит к увеличению лесопокрытых участков в среднем на 1000 га ежегодно. Весьма актуален вопрос территориального обозначения реликтовых популяций, определения их генетической принадлежности с целью сохранения генофонда и получения районированных семян и посадочного материала.

В современном лесном хозяйстве России и международной практике при разработке программ повышения устойчивости, продуктивности, качества, экологической адаптации лесов увеличивается интерес к вопросам сохранения генофонда основных лесобразующих пород. Эффективность мер по лесовосстановлению и сохранению генетического разнообразия древесных пород во многом зависит от реализации комплексных исследований в лесной селекции, семеноводстве, генетике, ботанике, экологии, географии и ландшафтоведении, популяционной биологии (Sannikov 1961, 1992; Sannikov, Sannikova, 1985). Степень изученности фундаментальных вопросов определяет качество формирования устойчивых высокопродуктивных насаждений, решает спорные вопросы теории эволюции вида, внутривидовых категорий, био-

систематики, экологии вида. Ключевой проблемой популяционной биологии является проблема вида, которая включает в себя понятия «популяция и ее объем», «структура», «границы», «пластичность» и «устойчивость» (Chernodubov, Chernodubova, 1993; Chernodubov, 1994, 2009).

Таким образом, была поставлена цель: изучить молекулярно-генетическое разнообразие естественного подроста островных боров и установить его генетическое сходство с реликтовым древостоем на территории Восточно-Европейской равнины и южной окраины Уральской горной страны в пределах Оренбургской области.

В качестве объекта исследования были выбраны реликтовые популяции *Pinus sylvestris*, занимающие пограничное положение с культурными насаждениями на территории Восточно-Европейской равнины – Бузулукский и Бугурусланский р-ны, а также на территории южной окраины Уральской горной страны – Адамовский р-н (рис. 1). В представленных районах отмечаются значительные площади подроста под пологом реликтового древостоя, что представляет интерес для молекулярно-генетической идентификации и его принадлежности к реликтовому древостою.

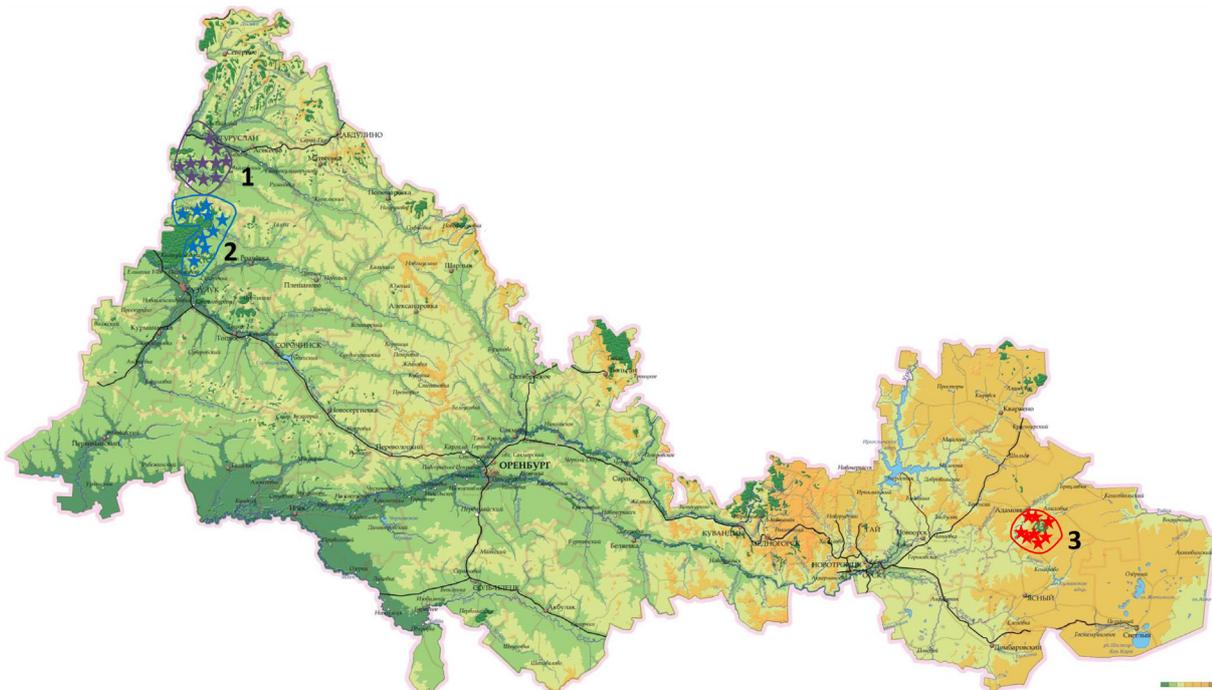


Рис. 1. Схема расположения изученных популяций *Pinus sylvestris* L. Обозначение популяций: 1 – популяция Бугурусланского; 2 – Бузулукского; 3 – Адамовского р-нов Оренбургской области.

Материалы и методы

Объектом исследований служили 3 популяций *P. sylvestris* в степной, лесостепной и лесной зонах Оренбургской области. Сведения о расположении реликтовых насаждений сосны обыкновенной были получены согласно сведениям министерства лесного и охотничьего хозяйства Оренбургской области.

Отбор проб был произведен в мае – июне 2017–2018 гг., хвоя отбиралась из средней части кроны реликтового древостоя, подростка и высушивалась в силикагеле. Географические координаты районов отбора проб приведены в таблице 1. Всего для молекулярно-генетических исследований была выделена ДНК от 45 деревьев, реакцию ISSR использовали на 30 образцах проб (Rjabuchina et al., 2019).

Таблица 1

Характеристика точек отбора проб для молекулярно-генетических исследований *Pinus sylvestris*

Район сбора	№ пробы	Координаты	Физико-географическое районирование Ландшафтно-ботаническая зона
1. Бугурусланский	25*	N 53°25,490' E 052°34,552'	Восточно-Европейская равнина, лесостепная зона, Заволжско-Предуральская возвышенная провинция, подзона южной лесостепи, Бугульминско-Белебеевский округ, разнотравно-ковыльные степи
	28*	N 53°25,508' E 052°34,575'	
	29*	N 53°25,508' E 052°34,575'	
	26	N 53°25,508' E 052°34,575'	
	30	N 53°25,764' E 052°35,038'	
	34	N 53°50,319' E 052°42,0295'	
	35	N 53°50,319' E 052°42,0295'	
	37	N 53°47,863' E 052°40,066'	
	38	N 53°47,863' E 052°40,066'	
2. Бузулукский	41	N 53°47,816' E 052°40,007'	Восточно-Европейская равнина, степная зона, Общесыртовско-Предуральская возвышенная провинция, подзона северной степи, Общесыртовский округ, типчаково-ковыльные степи
	45*	N 52°56,144' E 052°15,420'	
	55*	N 53°04,535' E 052°242,050'	
	66*	N 53°56,902' E 052°51,577'	
	42	N 52°56,144' E 052°15,420'	
	43	N 52°56,144' E 052°15,420'	
	44	N 52°56,144' E 052°15,420'	
	50	N 53°04,817' E 052°24,610'	
	51	N 53°04,817' E 052°24,610'	
	52	N 53°04,817' E 052°24,610'	
3. Адамовский	63	N 53°05,101' E 052°24,810'	Уральская горная страна, лесостепная зона, Зауральская высоко-равнинная провинция, подзона северной степи, типчаково-ковыльная степь
	64	N 53°05,101' E 052°24,810'	
	129*	N 51°26,805' E 060°06,449'	
	132*	N 51°26,805' E 060°06,449'	
	140*	N 51°26,655' E 060°06,656'	
	126	N 52°10,510' E 059°44,778'	
	127	N 52°10,510' E 059°44,778'	
	128	N 52°10,510' E 059°44,778'	
	131	N 51°26,805' E 060°06,449'	
138	N 51°26,655' E 060°06,656'		
139	N 51°26,655' E 060°06,656'		

Примеч.: * реликтовый древостой.

План исследования включал 3 этапа:

- 1) определение популяций реликтовых сосен, которые имеют подрост в пологе;
- 2) исследование генетической принадлежности реликтового древостоя ISSR-методом;
- 3) изучение генетической принадлежности подростка под пологом климаксовых реликтовых

популяций, расположенных на границе с культурными насаждениями ISSR-методом.

Выделение суммарной ДНК выполняли СТАБ методом с применением коммерческого набора «Analytik Jena» – комплект реагентов для выделения растительной ДНК (Германия). Протокол № 1 коммерческого набора был изменен с це-

люю связывания вторичных метаболитов, которыми богаты ткани хвойных, инактивирующих нуклеиновые кислоты (Ganopoulos et al., 2013). На стадии переноса гомогенизированной жидкости в префильтр для первичной фильтрации

был использован сорбент Sorbent Diamond DNA (Россия, Барнаул). Для проведения ПЦР реакции опытным путем были выявлено 6 полиморфных ISSR-праймеров, которые дают воспроизводимый результат (Wachowiak, 2009) (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность ISSR-PCR праймеров для изучаемых популяций *Pinus sylvestris*

Название ISSR-праймера	Последовательность (5'→3')	Количество амплифицированных фрагментов	
		мономорфные	всего
GR ₂₁₅	(CA) ₆ GT	2	34
UBC ₈₀₇	(AG) ₈ T	4	17
UBC ₈₁₈	(CA) ₈ G	2	16
UBC ₈₃₆	(AG) ₈ YA	3	25
X ₁₀	AGC(ACG) ₅ C	4	32
HB ₁₂	5(CAC) ₃ GC3	0	46

Реакцию ПЦР проводили в амплификаторе Professional Thermocycler Biometra (Германия) при следующем режиме: преденатурация – 01:30 мин. при температуре 94°C, далее 36 циклов (00:45 мин. – +94 °C, 00:45 мин. – +45 °C, 1:30 мин. – +72 °C), заключительный этап – 6:00 мин. – +72 °C и 90:00 мин. при температуре +12 °C. Разделение ДНК проводили в агарозных гелях с концентрацией агарозы 1,5 % в электрофорезной камере в TBE буфере применением бромистого этидия продолжительностью 3,5–4 часа при напряжении электрического поля 85V. Визуализацию ДНК проводили с помощью системы INTAS science imaging с использованием программы IntagGDS.

В качестве стандарта ДНК использовали маркер 100bp-DANN Leiter EXTENDED. ISSR анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос в геле, с последующим созданием матрицы. PCA анализ полученных данных был произведен при помощи программы «R» (<https://www.r-project.org>). Построение дендрограммы, отображающей степень сходства исследуемых популяций, а также определение генетической дистанции осуществлялось при помощи программы Mega 7.0 (Kumar et al., 2016). Для этого в матрице цифровые значения 1 и 0 заменили на буквенные (1 на T и 0 на A) и названия образцов отформатировали в Fasta формате. При определении генетического расстояния использовался коэффициент Джукса-Кантора (Jukes, Cantor, 1969).

Результаты

При изучении трех популяций реликтовых сосен и подроста ISSR-методом было получено 155 полиморфных маркерных признаков, что составляет 91 % от общего количества и 15 мономорфных. Используемые праймеры выявили от 16 до 46 фрагментов (табл. 2), максимальное число выявлено праймером HB₁₂; также высоко результативными были праймеры GR₂₁₅, X₁₀. Длины фрагментов ДНК варьировали от 150 до 1000 баз пар нуклеотидов. Следовательно, выбранные праймеры для ISSR-анализа являются полиморфными и высокоэффективными в отношении вида *P. sylvestris*.

Из 170 выявленных маркеров три (1,8 %) являются уникальными, так как представлены только в одной популяции, а 167 (98,2 %) – общими для всех изучаемых популяций. В популяциях Бузулукского и Адамовского р-нов Оренбургской области выявлено по одному уникальному ISSR-маркеру. В популяции Бугурусланского р-на уникальных ISSR-маркеров не обнаружено.

Генетическое разнообразие популяции оценивалось по индексу Шеннона, который выявил наибольшее разнообразие в популяциях Бугурусланского (0,27 ± 0,024) и Адамовского р-нов (0,28 ± 0,027); генетическое разнообразие популяции Бузулукского р-на ниже и составляет 0,15 ± 0,021.

Кластерный анализ, основанный на степени сходства популяций по ISSR-маркерным при-

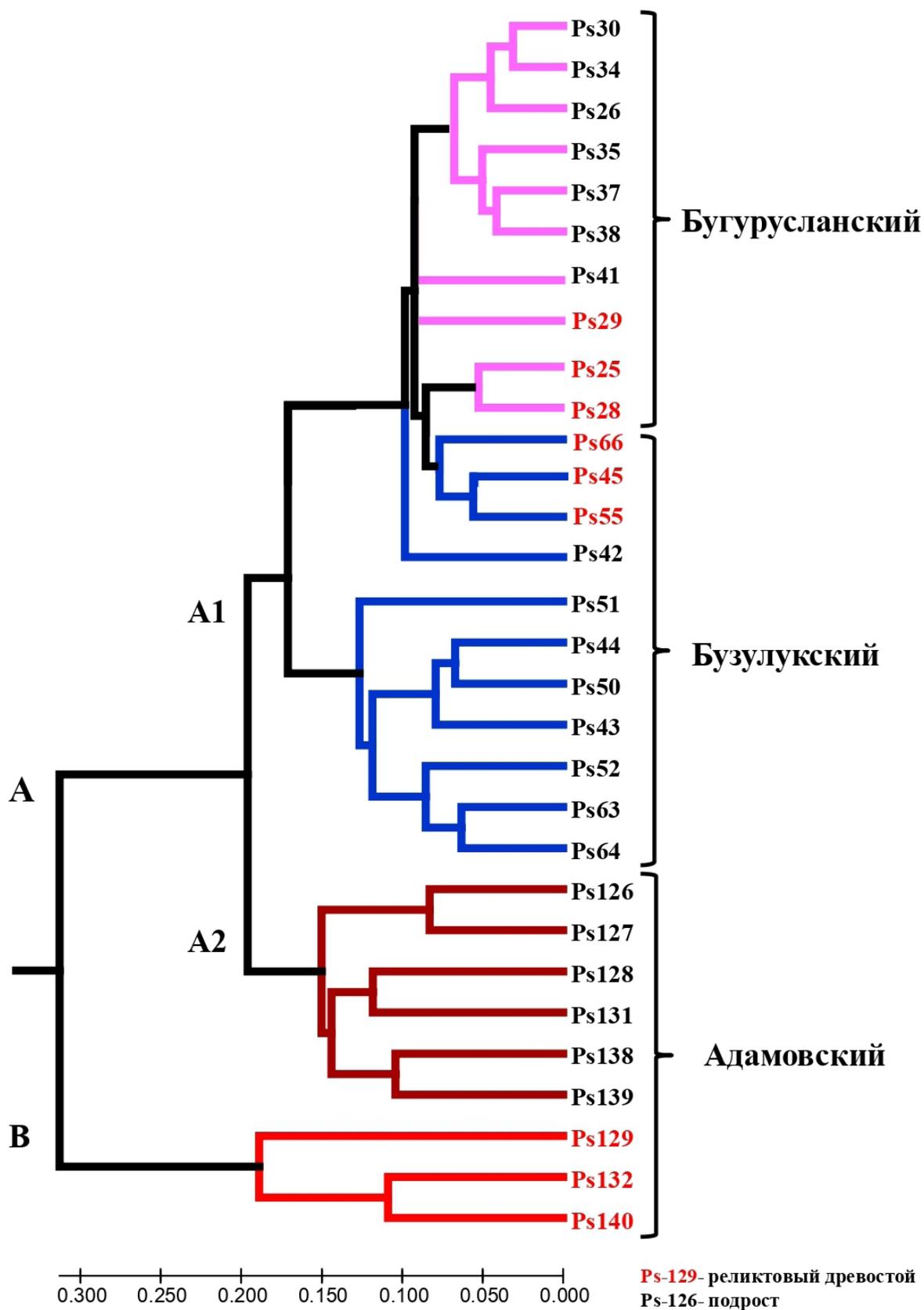


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства реликтового древостоя и подроста изученных популяций *Pinus sylvestris* L., построенная на основании полиморфизма ISSR-маркеров невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA); шкала снизу – генетические расстояния.

знакам, выявил, что разделение исследуемой выборки происходит на две генетические группы А и В.

В группу А входят реликтовые сосны и подрост популяций Бузулукского, Бугурусланского и частично Адамовского р-нов, которые в дальнейшем делятся на две подгруппы А1 и А2. Группа А1 образована 2 кластерами, в который вошли как реликтовые сосны, так и подрост Бугурусланского и Бузулукского р-нов. Группа А2 отличается от группы А1 тем, что образована только подростом Адамовского р-на.

Группа В образована одним, резко отличающимся от других, кластером, в который входят

реликтовые сосны Адамовского р-на, произрастающие на одной территории с подростом из группы А2.

Результаты анализа главных компонент указывают на обособленное положение выборки Адамовского р-на и перекрываемое положение популяций Бузулукского и Бугурусланского р-нов. При ординации выборка распределилась неравномерно (рис. 3), она представлена двумя четко обособленными группами.

В общей сумме исследуемая выборка делится на 4 генетических кластера (рис. 2).

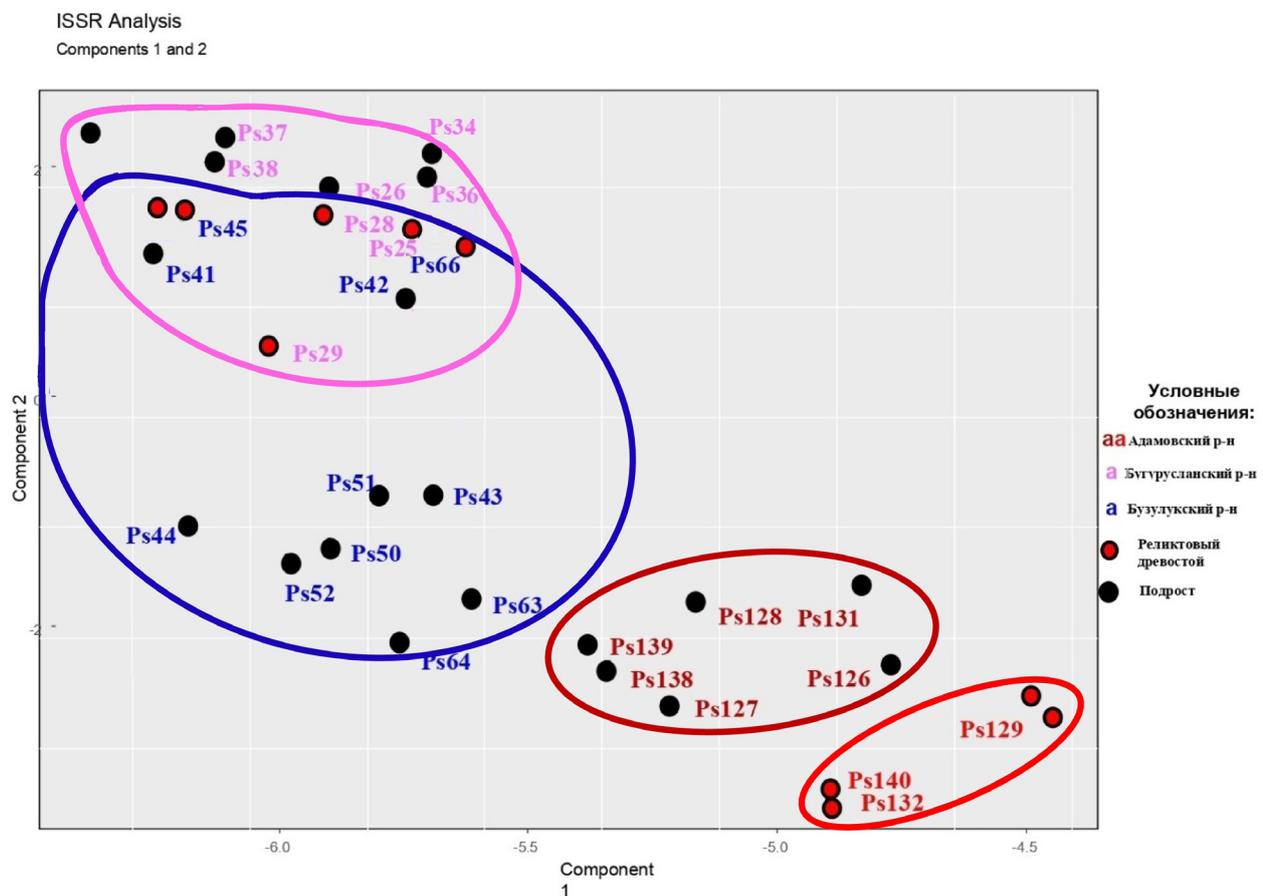


Рис. 3. Ординация изученных популяций *Pinus sylvestris* L. с помощью анализа главных компонент.

Обсуждение

Островные боры Восточно-Европейской равнины и южной окраины Уральской горной страны на территории Оренбургской области являются уникальными объектами исследований по ряду причин, в частности: произрастают в разных лесорастительных районах (Ryabinina, 1998; Chibilyov, 1999), почвенно-экологических усло-

виях – на песках и мелах (Rusanov et al., 2005; Ivanova et al., 2008). В результате эволюции прослеживается дифференциация популяции сосны на отдельные урочища, боры, которые имеют четкие границы. *P. sylvestris* – ценная лесообразующая, эволюционно древняя, долгоживущая и экономически перспективная порода, обладающая высокой генетической изменчивостью. В связи с этим усиливается актуальность вопросов

сохранения генофонда данного вида (Petrova, Sannikov, 1996; Sannikov, Petrova, 2003).

Настоящими исследованиями установлено генетическое сходство подроста и реликтового древостоя островных боров Восточно-Европейской равнины в пределах районов исследования. Принимая во внимание климаксовый период развития реликтовых популяций, близкое расположение культурных насаждений *P. sylvestris*, было значимым выявление факта вероятного самовосстановления малочисленного реликтового древостоя. Все отобранные пробы подроста Бугурусланского и Бузулукского р-нов по молекулярно-генетическим признакам идентичны реликтовым соснам, что может свидетельствовать об отсутствии перекрестного опыления с культурными насаждениями, отличающимися по генотипу. Данный вопрос требует более глубокого изучения, в том числе определения фенологических сроков пыления реликтовых и культурных сосен и определения генотипа культурных насаждений *P. sylvestris*. На сравнительно небольшой территории района исследования выявлено высокое генетическое внутривидовое разнообразие, которое может обуславливать различия в процессе репродукции.

При изучении последовательности отдельных фрагментов ДНК подроста и реликтового древостоя Адамовского р-на филогенетические связи между ними не установлены. Для детального изучения проблемного вопроса необходимо проведение дополнительных молекулярно-генетических исследований культурных насаждений *P. sylvestris*. Как отмечает Т. В. Филиппова с соавторами, на успешность лесовосстановления влияют природно-климатические условия южной окраины Уральской горной страны, а также

эколого-биологическое и репродуктивное состояние реликтового древостоя (Filippova et al., 2006). Высокое популяционное разнообразие в Адамовском р-не обусловлено генотипической разностью реликтового древостоя и подроста. Этот факт объясняет высокое значение индекса Шеннона на сравнительно небольшой по площади территории.

Географическая изоляция значительными расстояниями островных боров Восточно-Европейской равнины и южной окраины Уральской горной страны от основного ареала сосны обыкновенной привела к четкой генетической дифференциации реликтовых популяций изучаемого вида. Анализ главных компонент в программном комплексе «R» показал наличие двух обособленных групп. Частоты аллелей равновесных популяций подроста сосны Бузулукского и Бугурусланского р-нов, входящих в одну группу, характеризуются выровненным распределением, подрост Адамовского р-на занимает обособленное положение.

В связи с вышеизложенным, целесообразно рекомендовать Министерству природных ресурсов, экологии и имущественных отношений Оренбургской области, Министерству лесного и охотничьего хозяйства Оренбургской области, управлению национального парка «Бузулукский бор» использовать в качестве семенных плантаций реликтовый древостой, проводить планирование культурных насаждений более эффективно с целью снижения риска перекрестного опыления реликтовых и культурных популяций *P. sylvestris*, а также разработать и внедрить охранные мероприятия, направленные на сохранение и увеличение численности подроста реликтового древостоя.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Chernodubov A. I.** 1994. The problems of protecting the island forests of the East European Plain. In: *Okhrana lesnykh ekosistem i ratsionalnoye ispolzovaniye lesnykh resursov* [Protection of forest ecosystems and sustainable use of forest resources]. Vol. 3. Moscow. P. 88. [In Russian] (**Чернодубов А. И.** Проблемы охраны островных боров Восточно-Европейской равнины // Охрана лесных экосистем и рациональное использование лесных ресурсов. Т. 3. М., 1994. С. 88).
- Chernodubov A. I.** 2009. *Sosna obyknovennaya v ostrovnykh borakh Vostochno-Yevropeyskoy ravniny (istoriya – genetika – ekologiya – geografiya)* [Scots pine in the island forests of the East European Plain (history – genetics – ecology – geography)]. Voronezh: Voronezh State Forestry Academy. 156 pp. [In Russian] (**Чернодубов А. И.** Сосна обыкновенная в островных борах Восточно-Европейской равнины (история – генетика – экология – география). Воронеж: Воронежская гос. лесотехн. академия, 2009. 156 с.).
- Chernodubov A. I., Chernodubova O. A.** 1993. On the afforestation of cretaceous outcrops of the south of the Russian plain. *Lesnoy zhurnal* [Forest journal] 4: 95–97. [In Russian] (**Чернодубов А. И., Чернодубова О. А.** К проблеме облесения меловых обнажений юга Русской равнины // Лесн. журнал, 1993. № 4. С. 95–97).

Chibilyov A. A. 1999. *Geograficheskiy atlas Orenburgskoy oblasti* [Geographical Atlas of the Orenburg Region]. Orenburg: Institut stepi. 95 pp. [In Russian] (**Чибилёв А. А.** Географический атлас Оренбургской области. Оренбург: Ин-т степи УрОРАН, 1999. 95 с.).

Chibilyov A. A. 2015. Physical and geographical zoning of the Southern Urals as the basis for the formation of the ecological framework of the region. In: *Stepi Severnoy Yevrazii: materialy mezhdunarodnogo simpoziuma* [Steppes of Northern Eurasia: Materials of the Seventh International Symposium]. Orenburg. Pp. 916–919. [In Russian] (**Чибилёв А. А.** Физико-географическое районирование Южного Урала как основа для формирования экологического каркаса региона // Степи Северной Евразии: материалы седьмого междунар. симпоз. Оренбург, 2015. С. 916–919).

Chibilyov A. A., Chibilyov Ant. A. 2012. Natural zoning of the Urals, taking into account latitudinal zonality, altitudinal zonality and vertical differentiation of landscapes. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN* [Izvestia of RAS SamSC] 14(1–6): 1660–1665. [In Russian] (**Чибилёв А. А., Чибилёв Ант. А.** Природное районирование Урала с учётом широтной зональности, высотной поясности и вертикальной дифференциации ландшафтов // Известия Самарского научного центра РАН, 2012. Т. 14. вып. 1–6. С. 1660–1665).

Filipova T. V., Sannikov S. N., Petrova I. V., Sannikova N. S. 2006. *Fenogenogeografiya populyatsiy sosny obyknovennoy na Urale* [Phenogenogeography of populations of Scots pine in the Urals]. Ekaterinburg: Ural Branch of RAS. 123 pp. [In Russian] (**Филиппова Т. В., Санников С. Н., Петрова И. В., Санникова Н. С.** Феногеноеграфия популяций сосны обыкновенной на Урале. Екатеринбург: УрОРАН, 2006. 123 с.).

Ganopoulos J., Tsaballa A., Xanthopoulou A., Madesis P., Tsiftaris A. 2013. Cultivar Identification by High-Resolution-Melting (HRM) Analysis Using Gene-Based SNP Markers. *Plant. Mol. Biol. Report.* 31(3): 763–768. DOI: 10.1007/s11105-012-0538

Goncharenko G. G., Padutov V. E., Silin A. E. 1991. Genetic structure of populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Cretaceous pine (*Pinus cretacea* Kanen.) and their taxonomic relationships. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Proceedings of the USSR Academy of Sciences] 319(5): 1230–1234. [In Russian] (**Гончаренко Г. Г., Падутов В. Е., Силин А. Е.** Генетическая структура популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и сосны меловой (*Pinus cretacea* Kanen.) и их таксономические взаимоотношения // Докл. АН СССР, 1991. Т. 319, № 5. С. 1230–1234).

Gurskiy A. Ak., Safonov D. N., Litvinov S. N. 2003. On the assessment of the condition and reproduction of forests of the Orenburg region. In: *Lesa Urala i khozyaystvo v nikh* [Forests of the Urals and their economy: collection of scientific papers]. Iss. 23. Ekaterinburg. Pp. 39–43. [In Russian] (**Гурский А. Ак., Литвинов С. Н., Сафонов Д. Н.** К оценке состояния и воспроизводства лесов Оренбургской области // Леса Урала и хозяйство в них: сб. науч. трудов. Вып. 23. Екатеринбург, 2003. С. 39–43).

Gurskiy A. Ak., Safonov D. N., Gurskiy A. An. 2005. Assessment of the natural regeneration of pine forests of the Buzulukpinery depending on the main characteristics of the stands using the point method. In: *Aktualnyye problemy lesnogo kompleksa* [Actual problems of the forest complex: collection of scientific papers]. Iss. 10. Bryansk. Pp. 20–22. [In Russian] (**Гурский А. Ак., Сафонов Д. Н., Гурский А. Ан.** Оценка естественного возобновления сосняков Бузулукского бора в зависимости от основных характеристик насаждений балльным методом // Актуальные проблемы лесного комплекса: сб. науч. трудов. Вып. 10. Брянск, 2005. С. 20–22).

Jukes T. H., Cantor C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism*. Ed. H. N. Munro. New York: Academic Press. Pp. 21–132. DOI: 10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7

Ivanova V. S., Rusanov A. M., Teterin A. P., Kuryakova T. A. 2008. Study of model conditions for the properties of chernozems of the Orenburg Urals. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta* [Bulletin of the Orenburg State University] 10(92): 157–160. [In Russian] (**Иванова В. С., Русанов А. М., Тетерин А. П., Курякова Т. А.** Исследование модельных обусловленностей показателей свойств черноземов Оренбургского Предуралья // Вестник Оренбургского государственного университета, 2008. № 10(92). С. 157–160).

Kalyakina R. G., Ryabuhina M. V., Ryabinina Z. N., Anhalt E. M. 2018. *Ekologo-biologicheskiye osobennosti khvoynnykh porod derevyev v urbanizirovannoy srede* [Ecological and biological features of conifers in urban environments]. Orenburg: Publishing center of the Orenburg State Agrarian University. 171 pp. [In Russian]. (**Калыкина Р. Г., Рябухина М. В., Рябинина З. Н., Ангальт Е. М.** Эколого-биологические особенности хвойных пород деревьев в урбанизированной среде. Оренбург: издательский центр ОГАУ, 2018. 171 с.).

Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054

Kurnaev S. F. 1973. *Lesorastitelnoye rayonirovaniye SSSR* [Forest growing zoning of the USSR]. Moscow: Nauka. 203 pp. [In Russian] (**Курнаев С. Ф.** Лесорастительное районирование СССР. М.: Наука, 1973. 203 с.).

Petrova I. V., Sannikov S. N. 1996. *Izolyatsiya i differentsiatsiya populyatsiy sosny obyknovennoy* [Isolation and differentiation of common pine populations]. Ekaterinburg: Ural Branch of RAS. 159 pp. [In Russian] (**Петрова И. В., Санников С. Н.** Изоляция и дифференциация популяций сосны обыкновенной. Екатеринбург: УрОРАН, 1996. 159 с.).

Prishnivskaya Y. V., Nechaeva Yu. S., Krasilnikov V. P., Boronnikova S. V. 2016. Molecular genetic analysis of four populations of *Pinus sylvestris* L. in the east of the Russian Plain based on the polymorphism of ISSR markers. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta* [Bulletin of the Orenburg State University] 2(190): 88–93. [In Russian] (**Пришивская Я. В., Нечаева Ю. С., Красильников В. П., Боронникова С. В.** Молекулярно-генетический анализ четырех популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке Русской равнины на основании полиморфизма ISSR-маркеров // Вестник Оренбургского государственного университета, 2016. № 2(190). С. 88–93).

Rjabuchina M. V., Kalyakina R. G., Friesen N. 2019. Phylogeographic analysis of *Pinus sylvestris* in forest-steppe and steppe zones of the Orenburg Region. *Turczaninowia* 22, 2: 110–120 [In Russian] (**Рябухина М. В., Калыкина Р. Г., Фризен Н. В.** 2019. Филогеографический анализ *Pinus sylvestris* лесостепной и степной зон Оренбургской области // Turczaninowia, 2019, Т. 22, № 2. С. 110–120). DOI: 10.14258/turczaninowia.22.2.6

Rusanov A. M., Anilova L. V., Korshikova N. A., Voropaev S. B. 2005. Dynamics of the humus state of soils adjacent to the Buzuluksky pinery. In: *Problemy geokologii Yuzhnogo Urala* [Problems of geoecology of the Southern Urals: materials of the second all-russian scientific and practical conference]. Part 1. Orenburg. Pp. 239–243. [In Russian] (**Русанов А. М., Анилова Л. В., Коршикова Н. А., Воропаев С. Б.** Динамика гумусного состояния почв прилегающих к Бузулукскому бору территорий // Проблемы геоэкологии Южного Урала: материалы второй Всерос. науч.-практ. конф. (Оренбург, 4–5 октября 2005 г.) Ч. 1. Оренбург, 2005. С. 239–243).

Ryabinina Z. N. 1998. *Konspekt flory Orenburgskoy oblasti* [Summary of the flora of the Orenburg region]. Orenburg: Institut stepi. 163 pp. [In Russian] (**Рябинина З. Н.** Конспект флоры Оренбургской области. Оренбург: Ин-т степи УрОРАН, 1998. 163 с.).

Sannikov S. N. 1961. *Yestestvennoye vozobnovleniye sosny i mery sodeystviyay emu v Pripyshminskikh borakh* [Natural pine regeneration and measures to promote it in the Pripyshminsky pine forests]. Sverdlovsk: UF AN SSSR. 76 pp. [In Russian] (**Санников С. Н.** Естественное возобновление сосны и меры содействия ему в Припышминских борах. Свердловск: УФ АН СССР. 1961. 76 с.).

Sannikov S. N. 1992. *Ekologiya i geografiya yestestvennogo vozobnovleniya sosny obyknovlennoy* [Ecology and geography of natural regeneration of Scots pine]. Moscow: Nauka. 264 pp. [In Russian] (**Санников С. Н.** Экология и география естественного возобновления сосны обыкновенной. М.: Наука, 1992. 264 с.).

Sannikov S. N., Petrova I. V. 2003. *Differentsiatsiya populyatsiy sosny obyknovlennoy* [Differentiation of populations of Scots pine] Ekaterinburg: Ural Branch of RAS. 247 pp. [In Russian] (**Санников С. Н., Петрова И. В.** Дифференциация популяций сосны обыкновенной. Екатеринбург: УрОРАН, 2003. 247 с.).

Sannikov S. N., Sannikova N. S. 1985. *Ekologiyay estestvennogo vozobnovleniya sosny pod pologom lesa* [Ecology of natural regeneration of pine under the forest canopy]. Moscow: Nauka. 149 pp. [In Russian] (**Санников С. Н., Санникова Н. С.** Экология естественного возобновления сосны под пологом леса. М.: Наука, 1985. 149 с.).