

СНИЖЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ВЫСОКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МАРГИНАЛЬНЫХ РЕЛИКТОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS BRUTIA* TEN. В КРЫМСКО-КАВКАЗСКОМ РЕГИОНЕ

© 2020 г. С. А. Семерикова^{а, *}, Н. В. Семериков^б

^аИнститут экологии растений и животных УрО РАН, Россия 620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

^бБотанический сад УрО РАН, Россия 620144 Екатеринбург, 8 Марта, 202а

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 19.03.2019 г.

После доработки 17.05.2019 г.

Принята к публикации 10.06.2019 г.

Генетическое разнообразие в маргинальных популяциях древесных растений было изучено на примере сосны калабрийской *Pinus brutia* Ten. в восточном Причерноморье, на северо-восточном пределе ареала этого вида. В шести реликтовых популяциях Крыма и Кавказа исследована изменчивость микросателлитных локусов хлоропластной ДНК (срSSR), проведено сравнение с выборкой *P. brutia* из центральной части ареала (Турция), а также с другими видами сосен, обитающими в данном регионе, – сосной обыкновенной (*P. sylvestris* L.) и сосной черной (*P. nigra* Arn.), исследованными в трех популяциях каждая. У крымско-кавказских популяций *P. brutia* средний уровень внутрипопуляционного полиморфизма ($H = 0.3657$) был значительно ниже по сравнению с выборкой из основной части ареала в Турции ($H = 0.8857$) и причерноморскими популяциями *P. sylvestris* и *P. nigra* (среднее $H = 0.9580$ и $H = 0.9574$ соответственно). Выявлена высокая степень генетической дифференциации популяций *P. brutia* в Причерноморье ($R_{ST} = 9.81\%$). Кластеризация популяций по срSSR маркерам не связана с их географическим положением, и крымские популяции не отличаются от кавказских на таксономическом уровне. Вероятно, подразделенность выборок *P. brutia* по составу гаплотипов, а также различия в уровне внутрипопуляционной изменчивости (H от 0 до 0.6090) обусловлены малой численностью и изоляцией северных популяций сосны калабрийской. Впервые обнаружена значительная дифференциация между двумя уникальными местообитаниями *P. brutia* в Крыму, что выражается в специфичности состава срSSR гаплотипов. Показаны различия трех изученных видов сосен по четырем срSSR локусам, пригодные для идентификации видов.

Ключевые слова: популяционно-генетическая структура, дифференциация популяций, *Pinus brutia*, *Pinus nigra*, хлоропластная ДНК, срSSR

DOI: 10.31857/S0367059720010114

Генетическое разнообразие маргинальных популяций необходимо для адаптации к локальным условиям и одновременно для расширения видом своего ареала. Хотя сужение амплитуды экотопов, доступных для обитания на краю ареала, потенциально ужесточает стабилизирующий отбор, снижая изменчивость и соответственно потенциал для освоения новых экологических ниш, однако ослабление генетического потока из центра ареала уменьшает поступление генов, не адаптивных к локальным условиям, и улучшает возможности для экспансии [1].

В Крыму и на Кавказе в естественных условиях произрастают три вида сосен: бореальный вид сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) и два средиземноморских вида – сосна калабрийская (*P. brutia* Ten.) и сосна черная (*P. nigra* Arn.) [2, 3]. Здесь они обитают в отрыве от основных видовых

ареалов. Если сосна обыкновенная, образуя в Крыму и на Кавказе изолированный анклав и находясь в жесткой конкуренции с видами широколиственных лесов, вытеснена на небольшие и изолированные скальные участки, не пригодные для ее конкурентов, то средиземноморские сосны *P. brutia* и *P. nigra* в Крыму и на кавказском побережье Черного моря находятся на пределе устойчивости к низким зимним температурам [4, 5].

В этом отношении особенно выделяется *P. brutia* – восточно-средиземноморский вид, основная часть ареала которого охватывает Малую Азию [2, 3, 6, 7]. Насаждения *P. brutia* в Крыму и на Кавказе, находящиеся на крайнем северо-восточном пределе естественного существования, относят к наиболее древним реликтовым формациям сосновых лесов [8]. Эта сосна не встречается далее нескольких сот метров от моря, сглажи-

вающего пика наиболее низких зимних температур. В Крыму ареал *P. brutia* ограничен южной частью полуострова, где она произрастает в двух оторванных друг от друга районах: вблизи мыса Айя (р-н г. Балаклавы, площадь около 440 га) и в 120 км к востоку – вблизи г. Судака (около 20 га). Таким образом, крымские популяции *P. brutia* насчитывают около 15000 экз., общий ареал не превышает 460 га [7, 9]. На Кавказе ареал *P. brutia* представлен узкой полосой небольших рощ от окрестностей г. Анапы до мыса Пицунда [2, 5, 10, 11]. В Краснодарском крае общая площадь ее популяций составляет не более 1100 га. Растет *P. brutia* на небольших высотах от самого моря до 200–300 м над ур. м., часто на известняковых скалах, редко (в Пицунде) на равнине – конусе выноса р. Бзыбь.

До сих пор нет единого мнения о таксономическом статусе крымских и кавказских популяций *P. brutia* [2, 6, 7, 12]. В последнее время они обычно рассматриваются как таксоны в ранге одного вида [2, 13], в качестве подвидов или вариаций. По мнению А. Фарджуна [13], крымско-кавказские популяции относятся к *P. brutia* var. *pityusa* (Steven) Silba. Несмотря на малочисленность популяций, *P. brutia* var. *pityusa* демонстрирует широкий диапазон морфологической изменчивости [12], и некоторые отечественные морфологи (например, [14]) считают группы популяций Кавказа и Крыма отдельными видами: сосной пицундской *P. pityusa* Stev. на Кавказе и сосной Станкевича *P. stankewiczii* Sukacz. в Крыму. Более того, по мнению Л.В. Орловой [14], наиболее северные популяции кавказского побережья являются гибридными между *P. stankewiczii* и *P. pityusa*.

Все предыдущие исследования генетической изменчивости крымских и кавказских популяций *P. brutia* проведены с помощью аллозимного анализа [15–19]. На основе аллозимных данных было установлено, что популяции сосны пицундской и Станкевича не доходят до видового уровня и достаточно близки *P. brutia* из основного ареала [15, 17]. В работе С.Н. Санникова с соавт. [19] две изученные крымские выборки не отделялись от популяции Черноморского побережья Кавказа. И.И. Коршиков и Е.М. Горлова [18] сравнивали две имеющиеся крымские природные популяции (урочища Аязьма, Новый Свет), между которыми не было найдено существенных генетических различий. Однако предыдущие генетические исследования северо-восточных популяций *P. brutia* ограничивались аллозимными маркерами и не охватывали весь ее ареал в Крыму и на Кавказе. При этом оценки изменчивости варьировали в зависимости от использованного набора локусов: в одних работах [16] она характеризовалась как низкая, но в других [15, 18] как достаточно высокая, причем в крымско-кавказских популяциях изменчивость не была снижена по сравнению с *P. brutia* в Турции и Греции [15].

Дальнейшие исследования с использованием различных типов генетических маркеров должны пролить свет на генетическое разнообразие, дифференциацию и происхождение реликтовых популяций *P. brutia* и *P. nigra*, установить наличие или отсутствие недавнего генетического потока, что особенно важно при разработке мер охраны видов и популяций, находящихся под угрозой исчезновения. Хлоропластные микросателлиты, или простые нуклеотидные повторы (срSSR), обладают высокой скоростью мутирования, высокоизменчивы и селективно нейтральны [20, 21]. Хлоропластная ДНК (хпДНК) у видов сем. Pinaceae имеет отцовское наследование и передается с пыльцой, что определяет повышенную величину внутривидового генетического потока и позволяет хорошо разграничивать виды [22]. Кроме того, унипарентальное наследование хпДНК обуславливает двукратное (по сравнению с ядерными маркерами) снижение эффективного размера популяции и, как следствие, определяет большую их чувствительность в отношении сокращения численности [21, 23, 24]. Локусы срSSR применяли для изучения популяционной структуры, потока генов, а также демографической истории у видов хвойных [25–33].

Исследования *P. brutia* с использованием срSSR маркеров ранее проводились в основной (средиземноморской) части ареала – в Греции и Турции. В работе [25] срSSR маркеры хорошо различали близкородственные таксоны *P. halepensis*-комплекса, в том числе *P. brutia* (Турция), а также *P. brutia* subsp. *eldarica* (Иран), в популяциях которой было выявлено снижение изменчивости. Выполненное на основе срSSR исследование роли фактора высоты над уровнем моря в генетической дифференциации горных популяций *P. brutia* в Турции [34] показало значительную подразделенность разновысотных популяций, что, возможно, объясняется генетической приспособленностью *P. brutia* к локальным условиям.

Цель данной работы состояла в изучении уровня генетической изменчивости и дифференциации реликтовых популяций *P. brutia* в Крыму и на Кавказе между собой и с основным ареалом, уточнении их таксономического статуса, сравнении характера и величины изменчивости причерноморской *P. brutia* и двух других видов сосен, обитающих в данном регионе, – *P. sylvestris* и *P. nigra*. Для этого мы исследовали изменчивость срSSR локусов в семи популяциях *P. brutia* в Крыму, на Кавказе и в Малой Азии, а также в крымско-кавказских популяциях *P. sylvestris* и *P. nigra*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов хпДНК проводился для семи популяций *P. brutia*, трех крымско-кавказских популяций

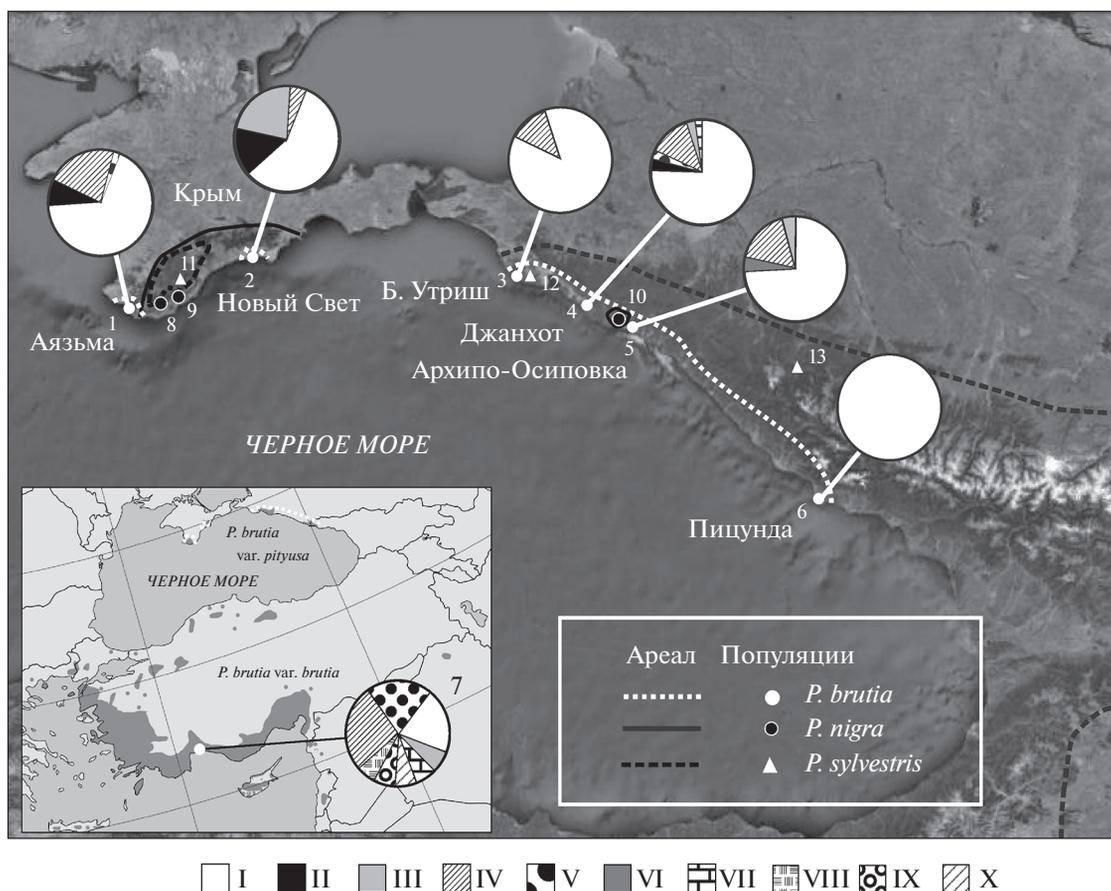


Рис. 1. Распределение cpSSR гаплотипов (I–X) в семи популяциях *Pinus brutia*. Ареалы и исследованные популяции (1–13) трех видов сосен в причерноморском регионе. Ареал *P. brutia* в Малой Азии приведен из EUFORGEN 2009 // URL: <http://www.euforgen.org>.

P. nigra и трех – *P. sylvestris* (табл. 1, рис. 1). В каждой популяционной выборке исследовали хвою с 23–50 деревьев, которые отбирали на расстоянии не менее 50 м друг от друга. На Черноморском побережье Кавказа были изучены четыре выборки *P. brutia*, начиная от самых северных местообитаний (Большой Утриш) до одного из наиболее южных (мыс Пицунда). В Крыму исследованы оба участка произрастания этого вида – урочища Аязьма (50 деревьев) и Новый Свет (40 деревьев). В крымских популяциях образцы были собраны в каждой популяции в ряде локалитетов, отстоящих друг от друга на расстоянии в несколько километров. Наше исследование, в отличие от предыдущих [15–19], охватывает весь ареал *P. brutia* var. *pityusa* в Крыму и на Кавказе. Из основного ареала вида в Средиземноморье изучены 15 индивидуумов из естественной популяции *Pinus brutia* var. *brutia* (Анталья, Турция) (табл. 1).

Сосна крымская – восточный подвид сосны черной *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe – была исследована в двух популяциях в Крыму и единственном местообитании этого

вида на Кавказе, в окрестностях пос. Архипо-Осиповка (см. рис. 1). Общая выборка для *P. nigra* составила 74 особи. У *P. sylvestris* изучены две выборки с Западного Кавказа и одна из Крыма, всего 87 деревьев.

ДНК выделяли с помощью метода СТАВ в соответствии с протоколом [35] из образцов свежей хвои. Исследовали четыре cpSSR локуса [27]: Pt15169, Pt26081, Pt30204 и Pt71936, для которых ранее был выявлен полиморфизм у *P. sylvestris* из основного ареала [31]. В выборках *P. brutia* были проверены на наличие изменчивости еще два cpSSR локуса – Pt41093 и Pt36480, у которых была обнаружена изменчивость в популяциях из Греции и Турции [25]. ПЦР, электрофорез и визуализация продуктов ПЦР соответствовали описанным в работах [26, 31]. Варианты размеров фрагментов рассматривали как аллели. Наиболее короткому из фрагментов присваивался номер 1, фрагменту длиннее на один нуклеотид – 2 и т.д. Поскольку рекомбинация у хлДНК отсутствует, то комбинация аллелей изменчивых локусов определялась как гаплотип. Для верификации

Таблица 1. Географическое расположение изученных выборок и показатели генетического разнообразия хлоропластных микросателлитных локусов (cpSSR) у трех видов сосен

№	Выборки	Координаты, с.ш./в.д.	<i>n</i>	<i>N</i>	<i>H</i>
<i>P. brutia</i>, Крым					
1	Аязьма	44° 27'/33° 39'	50	4	0.4922
2	Новый Свет	44° 49'/34° 54'	40	4	0.6090
	В среднем		45	4	0.5506
	Всего		90	5	
<i>P. brutia</i>, Кавказ					
3	Большой Утриш	44° 70'/37° 26'	23	2	0.2372
4	Джанхот	44° 40'/38° 08'	45	6	0.4172
5	Архипо-Осиповка	44° 21'/38° 32'	23	4	0.4387
6	Пицунда	43° 10'/40° 20'	30	1	0.0000
	В среднем		30.25	3.25	0.2733
	В среднем Крым–Кавказ		35.17	3.5	0.3657
	Всего для крымско-кавказских популяций <i>P. brutia</i>		211	7	
	$R_{ST} = 0.09806^* (P = 0.00018), G_{ST} = 0.06980^* (P < 0.00001)$				
<i>P. brutia</i>, Турция					
7	Анталья	36° 90'/30° 71'	15	8	0.8857
	В среднем для <i>P. brutia</i>		32.3	4.14	0.4400
	Всего для <i>P. brutia</i>		226	10	
	$R_{ST} = 0.07473^* (P = 0.00098), G_{ST} = 0.10863^* (P < 0.00001)$				
<i>P. nigra</i>					
8	Ай-Петри	44° 27'/34° 04'	23	13	0.9447
9	Никита, Крымский заповедник	44° 31'/34° 14'	27	15	0.9601
10	Архипо-Осиповка, Кавказ	44° 21'/38° 32'	24	17	0.9674
	В среднем		24.7	15	0.9574
	Всего для <i>P. nigra</i>		74	26	
	$R_{ST} = 0.05771^* (P = 0.04790), G_{ST} = 0.00000 (P = 0.52493)$				
<i>P. sylvestris</i>					
11	Гурзуф	44° 33'/34° 16'	29	17	0.9480
12	Большой Утриш	44° 45'/37° 25'	34	21	0.9550
13	Гузерипись	43° 59'/40° 07'	24	17	0.9710
	В среднем		29	18.3	0.9580
	Всего для <i>P. sylvestris</i>		87	39	
	$R_{ST} = 0.04985 (P = 0.05767), G_{ST} = 0.02156^* (P = 0.00489)$				

Примечание: *n* – размер выборки, *N* – число гаплотипов в популяции, *H* – параметр внутривидовой изменчивости. Приводятся индексы фиксации (AMOVA), вычисленные с учетом (R_{ST}) и без учета (G_{ST}) дистанций между гаплотипами; * – уровень значимости ($P < 0.05$).

структуры и размера амплифицируемого фрагмента, содержащего микросателлит, каждый обнаруженный аллель был секвенирован с помощью набора BigDye v.3.1 (Applied Biosystems). Редактирование и выравнивание полученных последовательностей выполняли вручную в программе BioEdit [36]. Для каждой популяции были вычислены следующие показатели изменчиво-

сти: общее число гаплотипов (*N*) и несмещенное гаплотипное разнообразие (*H*) [37].

Анализ структуры изменчивости AMOVA был проведен для двух иерархических уровней (внутри популяций, между популяциями). Вычисляли индексы фиксации: G_{ST} [37], основанный только на частотах гаплотипов, и R_{ST} [38], учитывающий

```

P. nigra 1n  TCCCCCCCCTTTTTTTTATTTTTTTTATTACTTTCTATTAGCCCT-----
P. brutia 1b TCCCCCCCCTTTTTTTTATGTTTTTATTACTTTCTATTAGCCCT-----
P. brutia 2b TCCCCCCCCTTTTTTTTATGTTTTTATTACTTTCTATTAGCCCT-----
P. brutia 3b TCCCCCCCCTTTTTTTTATGTTTTTATTACTTTCTATTAGCCCT-----
P. sylvestris 1s TCCCCCCCCTTTTTTTTATTTTTTTTATTACTTTCTATTAGCCCT-
P. sylvestris 2s TCCCCCCCCTTTTTTTTATTTTTTTTATTACTTTCTATTAGCCCT

```

Рис. 2. Изменчивый участок локуса Pt15169 у трех видов *Pinus*. Полу жирным шрифтом указана инсерция у *P. sylvestris*, серым цветом – точковая мутация у *P. brutia*. Описание изменчивости аллелей приводится в тексте.

генетическое расстояние между гаплотипами:

$$D_{sh}^2(i, j) = K^{-1} \left[\sum |a_{ik} - a_{jk}|^2 \right],$$

где a_{ik} и a_{jk} – числа повторов k -го микросателлита i -го и j -го гаплотипов, K – число локусов. Статистическую значимость индексов фиксации оценивали с помощью 1000 пермутаций. Вычисления производили в программе Arlequin v.3.5 [39]. Сравнение R_{ST} и G_{ST} осуществляли посредством алгоритма [40], реализованного в программе PermutCPSSR (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/>).

При R_{ST} достоверно больше G_{ST} генетически сходные гаплотипы имеют тенденцию сосуществовать в одной популяции. Ординация популяций *P. brutia* с помощью анализа главных координат осуществлялась посредством программы NTSYS-рс [41] на основе матрицы парных R_{ST} . Для оценки наличия связи между генетической и географической структурами *P. brutia* был выполнен тест корреляции генетических и географических дистанций Мантела [42], который вычислялся в программе NTSYS-рс на основе матрицы парных R_{ST} и матрицы географических дистанций между выборками [41].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Видоспецифичность хлоропластных микросателлитных локусов у трех видов сосен

У крымско-кавказских выборок *P. sylvestris* были изменчивы все четыре локуса (Pt15169, Pt26081, Pt30204, Pt71936), у *P. brutia* – локусы Pt15169, Pt71936 и Pt26081, у *P. nigra* – Pt30204, Pt71936 и Pt26081. Секвенирование аллельных вариантов каждого локуса подтвердило правильность типирования и показало, что внутри видов ближайшие по электрофоретической подвижности аллельные варианты отличаются между собой на один нуклеотид в соответствии с пошаговой моделью мутационного процесса микросателлитов.

Обнаружена видоспецифичность изменчивости четырех локусов, что выражается в длине и составе нуклеотидных последовательностей фрагментов. В локусе Pt15169 виды *P. nigra* и *P. brutia* резко отличаются от *P. sylvestris* и друг от друга

(рис. 2): у *P. nigra* обнаружен один вариант размера (аллель 1n), который на 7 пар нуклеотидов короче наиболее короткого аллеля *P. sylvestris*, а *P. brutia* отличается от *P. nigra* точковой мутацией “G” в микросателлите и длиной фрагментов, самый короткий из которых (аллель 1b) на 1 нуклеотид длиннее аллеля 1n у *P. nigra*. Варианты фрагментов у *P. sylvestris* еще длиннее из-за инсерции (“ATCT”) во фланкирующей области микросателлита (см. рис. 2).

В локусе Pt71936 у *P. sylvestris* встречаются 6 аллелей, у *P. brutia* и *P. nigra* – 6 и 3 соответственно (рис. 3). Варианты размеров отличаются количеством повторов “T”. В локусе Pt26081 у *P. sylvestris* и *P. nigra* обнаружено по 3 аллеля, у *P. brutia* – 2, с разным количеством повторов “T”. Кроме того, у *P. brutia* и *P. nigra* в последовательности микросателлита после повторов “T” расположен один нуклеотид “A”, отличающий их от *P. sylvestris* (два “A”).

В локусе Pt30204 у *P. brutia* найден только один аллель, который короче на 3 нуклеотида самого короткого варианта у *P. sylvestris* и на 4 – у *P. nigra*, что делает данный локус диагностическим для *P. brutia*. У *P. sylvestris* встречаются 7 аллелей. У *P. nigra* в этом локусе шесть вариантов размеров, не совпадающих, однако, по последовательностям с аналогичными по длине аллелями *P. sylvestris*: в начале микросателлита у *P. nigra* и *P. brutia* обнаружено 2 “T”, у *P. sylvestris* – 3 или 4.

Таким образом, диагностическим для трех изученных видов сосен является локус Pt15169, по которому можно определить видовую принадлежность без секвенирования. Локус Pt30204 при использовании только электрофореза является диагностическим для *P. brutia*, а при секвенировании – также и для *P. nigra*. Для *P. sylvestris* диагностическим при секвенировании является локус Pt26081, но он не позволяет различать образцы *P. brutia* и *P. nigra*. Кроме различий в длине и нуклеотидных последовательностях аллелей, три вида сосен значительно отличались между собой по сочетаниям аллелей в гаплотипах и не имели общих cpSSR гаплотипов.

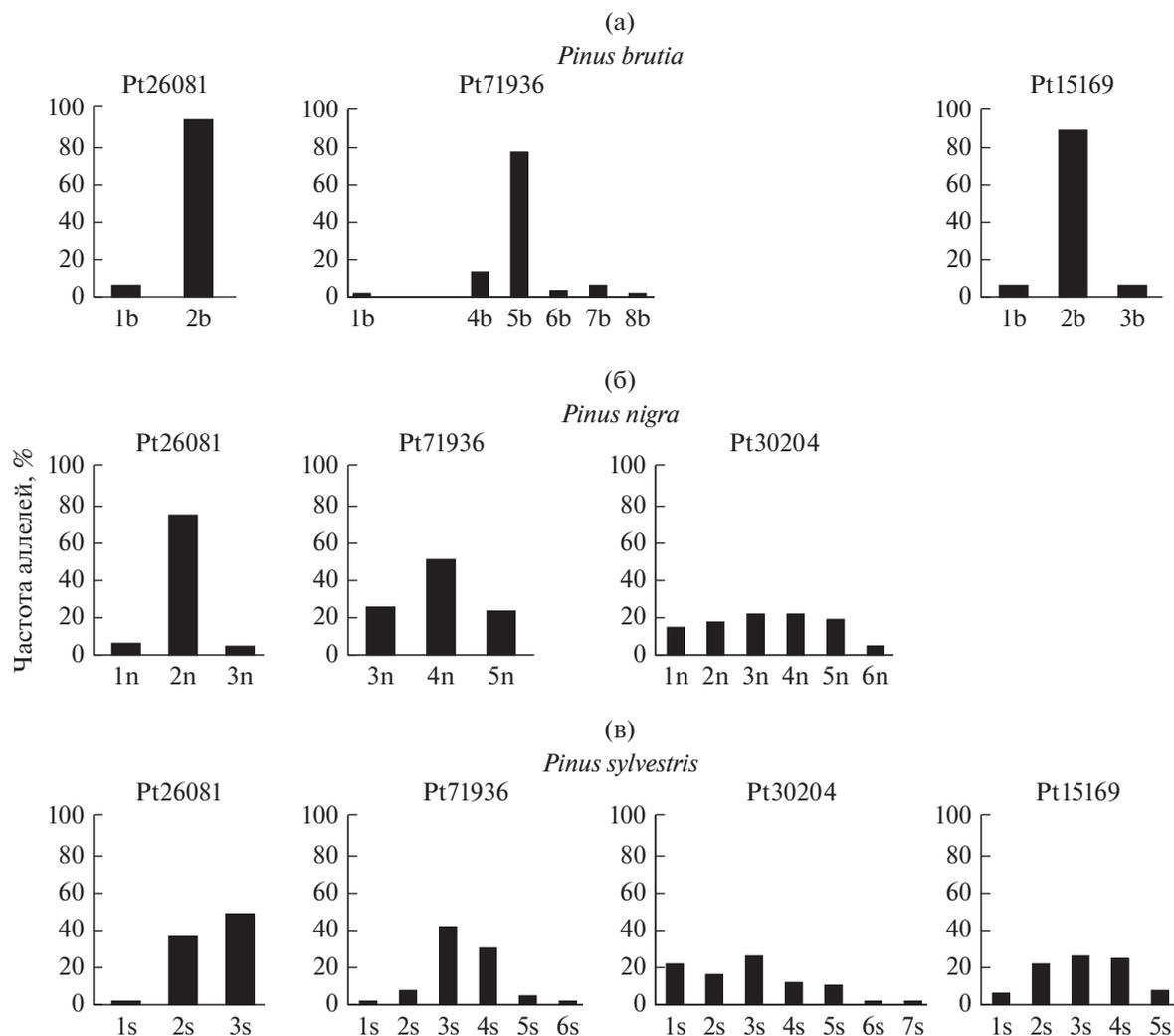


Рис. 3. Частоты аллелей в изменчивых cpSSR локусах у *P. brutia* (а), *P. nigra* (б) и *P. sylvestris* (в).

Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов и дифференциация популяций у P. brutia, P. nigra и P. sylvestris

В результате изучения 226 индивидуумов в семи популяциях *P. brutia* в изменчивых локусах Pt26081, Pt71936, Pt15169 было выявлено по 2, 6 и 4 аллеля соответственно (см. рис. 3). Распределение аллелей было неравномерным. Редкие аллели 1b и 8b в локусе Pt71936 обнаружены только в турецкой выборке. Изменчивости в локусах Pt41093 и Pt36480 в исследованных выборках не оказалось. В шести cpSSR локусах у черноморской *P. brutia* в среднем обнаружено по 2 аллеля на локус (от 1 до 4). Среднее внутривидовое разнообразие было невысоким ($H = 0.3657$), варьируя от 0.6090 (Новый Свет) до 0 (Пицунда). В турецкой выборке уровень генетического разнообразия был существенно выше ($H = 0.8857$), в среднем выявлено по 2.33 аллеля на локус (от 1 до 6 аллелей).

В сумме в семи популяциях *P. brutia* встретилось 10 гаплотипов: из них в крымско-кавказских популяциях – 7, в турецкой выборке – 8 (см. рис. 1). Аллельный состав гаплотипов приведен в табл. 2. Три доминирующих гаплотипа (I, II, IV) близкородственны, отличаются друг от друга 1–2 мутациями. На эти гаплотипы в Крымско-Кавказском регионе приходится 92.9%. Более дивергентный гаплотип III (4–5 мутаций от гаплотипов I, II, IV) встретился в трех выборках, с частотой чуть больше 5%, однако в популяции Новый Свет его доля сильно повышена (22%). Остальные гаплотипы встретились один или два раза. В целом в кавказских популяциях обнаружено больше гаплотипов (7), чем в крымских (5), за счет выявления редких вариантов в выборках Джанхот и Архипо-Осиповка в центральной части кавказского ареала *P. brutia*. Из всех изученных популяций наиболее дивергированы две крымские выборки (рис. 4). В обеих выборках обнаружено по четыре гаплоти-

Таблица 2. Аллельный состав гаплотипов трех изменчивых *срSSR* локусов в популяциях *P. brutia*, встречаемость гаплотипов по регионам

Гаплотипы <i>P. brutia</i>	Аллели в <i>срSSR</i> локусах			Количество деревьев		
	Pt26081	Pt71936	Pt15169	Крым, Кавказ	Анталья	всего
I	2b	5b	2b	158	3	161
II	2b	5b	3b	12	—	12
III	1b	7b	1b	11	1	12
IV	2b	4b	2b	26	4	30
V	2b	6b	2b	2	3	5
VI	2b	7b	2b	1	—	1
VII	2b	6b	3b	1	1	2
VIII	2b	1b	2b	—	1	1
IX	1b	8b	1b	—	1	1
X	2b	8b	2b	—	1	1
Всего				211	15	226

па, состав которых существенно различается (см. рис. 1): в выборке Новый Свет, кроме гаплотипа I (57.5%), преобладают гаплотипы III и II (22.5 и 15% соответственно); в Аязьме, кроме I (68%), часто встречались IV и II (22 и 8%). Гаплотип III не обнаружен в Аязьме, гаплотип V — в Новом Свете.

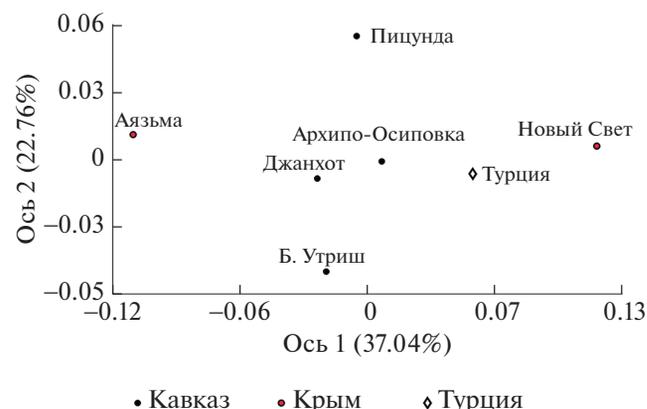
По частотам гаплотипов крымско-кавказские популяции отличаются от турецкой выборки незначительно (см. табл. 2). Наиболее частый для Крымско-Кавказского региона гаплотип I (75%), преобладающий во всех выборках, встретился в турецкой популяции 3 раза (20%). Вторым по частоте гаплотип IV (12.3%) встретился во всех популяциях Крыма и Кавказа, кроме Пицунды, в турецкой выборке оказался преобладающим (26.7%). Один из гаплотипов (II), который встретился в трех черноморских выборках и концентрация которого была выше в Крыму (11.1%), не был отмечен в выборке из Турции. Три редких гаплотипа (VIII, IX, X) встретились только в турецкой выборке.

Дифференциация семи популяций *P. brutia*, вычисленная с учетом различий между гаплотипами, составляла $R_{ST} = 7.47\%$ (см. табл. 1). Индекс фиксации R_{ST} не отличался значимо от G_{ST} ($P = 0.6600$), что подтверждает отсутствие филогеографической структуры. Результаты теста Мантела для *P. brutia* незначимы ($P = 0.476$). Ординация популяций также не выявляет географической структуры (см. рис. 4). Подразделенность шести черноморских выборок (без Турции) еще выше ($R_{ST} = 9.81\%$).

В крымских и кавказской популяциях *Pinus nigra* в локусах Pt26081 и Pt71936 обнаружено по 3 аллеля, в локусе Pt30204 — 6, при этом распределение аллелей более равномерное и унимодальное, чем у *P. brutia* (см. рис. 3). Всего в трех выборках у 74 деревьев выявлено 26 гаплотипов: наиболее

частые гаплотипы (с частотой не менее 6%) встречались и в Крыму, и на Кавказе (у 42% особей); 12 гаплотипов встретились в какой-то одной выборке, из которых 4 — в Никите, 3 — на Ай-Петри и 5 — в Архипо-Осиповке. Популяции *P. nigra* характеризуются одинаково высоким значением генетического разнообразия (среднее $H = 0.9574$), дифференциация трех популяций $R_{ST} = 5.77\%$, значение G_{ST} незначимо (см. табл. 1).

В трех крымско-кавказских популяциях *P. sylvestris* в локусах Pt15169, Pt26081, Pt30204 и Pt71936 выявлено по 5, 3, 7 и 6 аллелей соответственно, у 87 деревьев найдено 39 гаплотипов. В отличие от *P. brutia* и *P. nigra* у нее отсутствовали доминирующие гаплотипы. Только два наиболее частых гаплотипа присутствуют во всех выборках, всего три встретились более пяти раз. Большинство (26) гаплотипов обнаружены в какой-то одной из выборок. Уровень *срSSR* изменчивости вы-

**Рис. 4.** Ординация семи популяций *P. brutia*, построенная на основе *срSSR* локусов, парных значений R_{ST} и анализа главных координат.

сок для всех трех популяций (среднее $H = 0.958$). Дифференциация исследованных выборок *P. sylvestris* составляла $G_{ST} = 2.16\%$, при этом R_{ST} было незначимо (см. табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокая дифференциация при отсутствии таксономических различий крымско-кавказских популяций P. brutia

На основании изучения изменчивости сpSSR можно сделать вывод, что крымские и кавказские популяции *P. brutia* являются единой группой родственных популяций и не имеют таксономических отличий от основного ареала на видовом уровне, что согласуется с предыдущими данными на основе изучения аллозимных маркеров [17]. Значительных отличий в составе сpSSR аллелей и гаплотипов между турецкой выборкой и черноморскими популяциями *P. brutia* не выявлено. Не подтверждается разделение крымско-кавказских популяций на виды *P. stankewiczii* и *P. pityusa*, соответственно не подтверждается и гибридизация в популяциях, растущих от Анапы до Джанхота [14].

Высокая дифференциация популяций *P. brutia*, выявленная в Крыму и на Кавказе ($R_{ST} = 9.81\%$ для шести популяций), объясняется малым размером популяций и их длительной изоляцией друг от друга при слабом генном потоке [16]. Гаплотипы распределены в популяциях случайным образом. Одновременно не выявлена изоляция расстоянием и нет географически обусловленной кластеризации популяций. Очевидно, дифференциация, а также уровень изменчивости популяции *P. brutia* обусловлены эффектом основателя и генетическим дрейфом.

В нашем исследовании с использованием маркеров сpSSR впервые выявлена значительная генетическая дифференциация популяций *P. brutia* в Крыму. Две крымские популяции Аязьма и Новый Свет (т.н. сосна Станкевича и сосна судакская, иногда относимые к виду *P. stankewiczii* [14], или подвиду *P. brutia* ssp. *stankewiczii* [15]) отличаются между собой по генетическим дистанциям в большей степени, чем от кавказских популяций, относящихся, согласно [14], к *P. pityusa* (см. рис. 4). Несмотря на значительно большую современную численность и лучшее возобновление *P. brutia* в урочище Аязьма, показатель генетического разнообразия ($H = 0.4922$) был ниже, чем в популяции Новый Свет ($H = 0.6090$). В отличие от аллозимных данных [18], где разница между двумя популяциями была несущественной и ниже, чем между локалитетами внутри популяций, в нашем исследовании разница между отдельными локалитетами не выражена (данные не приводятся), однако между двумя крымскими популяциями оказывается достаточно большой. Выраженные отличия по составу гаплотипов и отсутствие в

урочище Аязьма одного из преобладающих в Новом Свете гаплотипа (III) свидетельствуют о прекращении генетического потока между этими популяциями на протяжении длительного времени и изолированном существовании *P. brutia* в двух уникальных местообитаниях Крыма.

Снижение уровня изменчивости в реликтовых популяциях P. brutia на северо-восточном пределе ареала

Установлено резкое снижение сpSSR изменчивости в черноморских популяциях *P. brutia* ($H = 0.3657$, в среднем по 2 аллеля на locus) по сравнению с популяцией из основного ареала, в которой, несмотря на небольшое количество исследованных образцов, обнаружены более высокие показатели изменчивости ($H = 0.8857$; 2.3 аллеля на locus), что согласуется с предыдущими данными по изменчивости *P. brutia* в Греции и Турции [25] – в тех же локусах здесь обнаружено в среднем по 3.3 аллеля на locus. В то же время в выборках сосны эльдарской (*P. brutia* var. *eldarica* (Medv) Silba) из Азербайджана и Ирана [25] также наблюдалось снижение разнообразия (2.2 аллеля на locus). Выявленное нами снижение изменчивости *P. brutia* var. *pityusa*, которое ранее не было показано аллозимными данными [15], указывает на большую чувствительность сpSSR маркеров по сравнению с ядерными к сокращению численности популяций благодаря уменьшенному в два раза эффективному размеру популяции.

Несоответствие между численностью и уровнем изменчивости у ряда популяций *P. brutia* свидетельствует о преобладающем влиянии на их генетическую структуру не современного их состояния, а таких исторических факторов, как событие основания популяции. Например, наименьшая изменчивость обнаружена в популяции с высокой современной численностью (Пицунда), где фиксирован наиболее частый в крымско-кавказских популяциях гаплотип I. Генетическая бедность популяции Пицундской роши, вероятно, обусловлена геологической историей приморской косы в устье р. Бзыбь, на которой она произрастает. Очевидно, что формирование косы связано со стабилизацией уровня Черного моря, которая произошла около 5 тыс. л.н. [43], и, следовательно, формирование дельты реки и заселение ее *P. brutia* происходило в историческое время. Относительная изолированность равнинной популяции в Пицунде от древостоев *P. brutia* на горных склонах обусловила эффект основателя, следствием чего является наличие в популяции только одного (наиболее распространенного) сpSSR гаплотипа, несмотря на высокую современную численность и хорошее возобновление *P. brutia* в Пицундской роше.

Значительная подразделенность популяций *P. brutia* в Крыму и на Кавказе и низкая изменчивость сpSSR, вероятно, обусловлены сильным сокращением численности в прошлом, во время последнего плейстоценового оледенения, либо, по мнению [7], во время морской трансгрессии около 7 тыс. л.н. Ранее на основе аллозимных маркеров [15] была обнаружена дифференциация крымской *P. brutia* от основного ареала, выраженная в большей степени, чем для кавказской выборки из Пицунды. Было сделано предположение об исторической изоляции данных популяций после сокращения и фрагментирования ареала *P. brutia* в его северо-восточной части в плейстоцене, при дальнейшем распространении вида в западной и южной частях (Малая Азия, о-ва Эгейского и Средиземного морей) [15].

Характер генетической изменчивости *P. brutia* сходен с таковым для других видов сосен, имеющих ограниченное или фрагментарное распространение: *P. halepensis* Mill., *P. pinea* L., *P. strobiformis* Engelm. и др. [24, 27, 44 и др.], изменчивость сpSSR у которых ниже, а уровень дифференциации популяций по данным маркерам значительно выше, чем у широко распространенных видов, например у *P. sylvestris* основного ареала [31] или *Picea obovata* [32]. Снижение сpSSR изменчивости в реликтовых популяциях *P. brutia* наблюдается также по сравнению с исследованными в тех же районах популяциями сосен *P. nigra* и *P. sylvestris*. Ранее было установлено [16], что показатели аллозимной изменчивости у *P. brutia* были более чем в два раза ниже, чем у *P. nigra* в Крыму и *P. sylvestris* из основного ареала.

У сосны черной, произрастающей, как и *P. brutia*, в Крымско-Кавказском регионе на крайнем северо-восточном пределе ареала, для всех популяций выявлено высокое генетическое разнообразие (среднее $H = 0.9574$), сравнимое с разнообразием крымско-кавказских популяций сосны обыкновенной ($H = 0.958$). В Крыму это обусловлено значительной численностью *P. nigra* на полуострове, где она преобладает среди других видов хвойных [2, 4] и где для популяций этого вида ранее была показана высокая величина генного потока [16]. Изоляция кавказской популяции, имеющей локальное распространение в районе п. Архипо-Осиповка [11], не привела к снижению уровня изменчивости сpSSR локусов и существенной ее дифференциации от крымских выборок, что свидетельствует о стабильно высоком эффективном размере популяции. Вероятно, еще недавно численность сосны черной на Кавказе была выше современной [11]. Следует отметить, что *P. nigra* — более распространенный средиземноморский вид, чем *P. brutia* [3, 33]. По данным К.Д. Найденова с соавт. [33], популяции *P. nigra* Крыма и Кавказа входят в один несмешанный кластер, объединяющий их с восточной Турцией,

при этом значительного снижения изменчивости в Крымско-Кавказском регионе у сосны черной не наблюдалось.

Для трех исследованных популяций *P. sylvestris* средний уровень изменчивости ($H = 0.958$) был несколько ниже, а дифференциация ($G_{ST} = 2.16\%$) сравнима с полученными ранее величинами для 38 выборок сосны обыкновенной из основной части ареала (среднее $H = 0.976$, $R_{ST} = 2.1\%$) [31]. Однако для этого вида, более распространенного в кавказском регионе по сравнению с *P. brutia* и *P. nigra* (см. рис. 1), необходимы дальнейшие исследования изменчивости сpSSR маркеров для всего крымско-кавказского ареала.

Применение генетических данных для разработки дополнительных мер охраны и перспективы использования изученных сосен в лесоразведении

Несмотря на то, что таксономическая (видовая) дифференциация в причерноморских популяциях *P. brutia* не подтверждается, выявлена их значительная подразделенность при сниженном генетическом потоке между собой и из центра ареала. При этом исторически изолированные и генетически дифференцированные популяции в разнообразных местообитаниях вне основного ареала могли накопить приспособления к условиям северо-восточного предела распространения и, следовательно, преадаптации к различным факторам, в первую очередь к пониженным (и периодически отрицательным) зимним температурам. Это, вероятно, также относится к сосне крымской. Адаптация маргинальных популяций сосен крымской и пицундской к экстремальным для этих видов климатическим условиям требует внимательного отношения к охране их генетического потенциала. Важно отметить, что полученные результаты следует учитывать также для разработки мер по лесовосстановлению на юге России в связи с проблемой глобального изменения климата и в условиях возможного значительного повышения температур в средних широтах уже в текущем столетии.

К сожалению, площади естественных насаждений *P. brutia* и *P. nigra* в результате рубок, пожаров, проведения дорог и строительства значительно сокращаются [11]. Хотя *P. nigra* включена в Красную книгу Краснодарского края, но для сохранения ее высокого генетического разнообразия необходим полный запрет рубок и организация ООПТ близ п. Архипо-Осиповка, в районе ее произрастания на Кавказе [11]. Отметим, что в Крыму естественные насаждения сосен *P. nigra* и *P. sylvestris* имеют наивысший уровень охраны и охраняются в нескольких природных заповедниках [45].

P. brutia занесена в Красную книгу России [5]. На Кавказе она охраняется в северной части аре-

ала, в заповеднике “Большой Утриш”. Крупный равнинный массив находится под охраной в южной части кавказского ареала, в Пицундо-Мюссерском заповеднике (Абхазия). В то же время значительная дифференциация популяций этого вида и слабая устойчивость фитоценозов с участием сосны пицундской [8] делают необходимым охрану и некоторых других местонахождений. Результаты изучения сообществ сосны пицундской [8] предполагают организацию дополнительных ООПТ в центральной части кавказского ареала (р-н Джанхота, Архипо-Осиповки), что совпадает с выявленным в нашей работе районом максимального генетического разнообразия популяций *P. brutia* на кавказском побережье.

В Крыму степень охраны естественных популяций *P. brutia*, очевидно, также недостаточна. Древостои этой сосны остаются в составе лесничеств, имея статус заказников [45]. Показанная в нашей работе генетическая уникальность двух крымских популяций *P. brutia* дает основание рассматривать их как эволюционно значимые единицы (evolutionarily significant units, ESUs [28, 46]), с должным уровнем охраны и разработки мер восстановления популяций, особенно с учетом увеличения рекреационной нагрузки в последние годы [47].

Таким образом, выявленная сниженная изменчивость и увеличенная дифференциация причерноморских популяций *P. brutia* по сравнению с *P. nigra*, *P. sylvestris* и популяцией *P. brutia* из основной части ареала предположительно являются следствием малого размера и длительной изоляции популяций друг от друга, что в свою очередь обусловлено узостью прибрежной зоны, пригодной для обитания *P. brutia* в этой периферической части ареала. Полученные нами данные могут быть использованы при разработке мер охраны реликтовых популяций *P. brutia* и *P. nigra*.

Авторы выражают благодарность Е.Г. Филиппову, М.В. Модорову, В.Л. Семерикову, В.В. Кукарских за помощь в сборе материала. Сбор материала выполнялся в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, молекулярно-генетический анализ поддержан программой УрО РАН (проект № 18-4-4-43).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirkpatrick M., Barton N.H. Evolution of a species' range // *American naturalist*. 1997. V. 150. № 1. P. 1–23. <https://doi.org/10.1086/286054>
2. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. Л.: Наука, 1978. 189 с.
3. Farjon A., Filer D. An atlas of the world's conifers: an analysis of their distribution, biogeography, diversity, and conservation status. Brill, Leiden-Boston. 2013. 512 p.
4. Дудух Я.П. Растительный покров горного Крыма. Киев: Наукова думка, 1992. 256 с.
5. Красная книга Российской Федерации (Растения и грибы). Сост. Камелин Р.В. и др. М.: Тов. научн. изд. КМК, 2008. 885 с.
6. Frankis M. *Pinus brutia* // *Curtis's Botanical Magazine*. 1999. V. 16. № 3. P. 173–184.
7. Yena An., Yena Al., Yena V. “Stankiewicz pine” in Crimea: some new taxonomical, chorological and paleo-landscape considerations // *Dendrobiology*. 2005. V. 53. P. 63–69.
8. Литвинская С.А., Постарнак Ю.А. Сосна пицундская – редкий вид Черноморского побережья России (генофонд, ценофонд, экофонд). Краснодар: КГУ, 2000. 311 с.
9. Флора СССР. В 30 т / Гл. ред. акад. Комаров В.Л.; ред. тома Ильин М.М. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1934. Т. I. С. 166–167.
10. Колесников А.И. Сосна пицундская и близкие к ней виды (о соснах пицундской, эльдарской, брутской и аллепской). М.: Гослесбуиздат, 1963. 175 с.
11. Красная книга Краснодарского края (Растения и грибы). Отв. ред. Литвинская С.А. Краснодар: ООО “Дизайн Бюро № 1”, 2007. 640 с.
12. Ена Ан.В. Новые данные об эндемиках флоры Крыма // *Укр. бот. журн.* 2006. V. 63. № 2. С. 143–152.
13. Farjon A. World checklist and bibliography of Conifers. Kew, UK, 2001. 309 p.
14. Орлова Л.В. Таксономический обзор семейства Pinaceae Кавказа // *Бот. журнал*. 2002. Т. 87. № 7. С. 99–107.
15. Conkle M.T., Schiller G., Grunwald C. Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *P. brutia* and closely related taxa // *Systematic Botany*. 1988. V. 13. № 3. P. 411–424.
16. Гончаренко Г.Г. Генный поток в природных популяциях сосен (Палеарктика) // *Лесоведение*. 2002. № 4. С. 30–36.
17. Гончаренко Г.Г., Болсун С.И., Нево Э., Захави А. Генетико-таксономические взаимоотношения у сосны пицундской, сосны Станкевича и сосны брутской // *ДАН*. 1998. Т. 359. № 4. С. 565–568.
18. Коршиков И.И., Горлова Е.М. Генетическая структура, подразделенность и дифференциация популяций сосны Станкевича в горном Крыму // *Генетика*. 2006. Т. 42. №6. С. 824–832. [Korshikov I.I., Gorlova E.M. Genetic structure, subdivision, and differentiation in Stankewiczii pine (*Pinus stankewiczii* (Sukacz.) Fomin) populations from mountainous Crimea // *Rus. J. of Genetics*. 2006. V. 42. № 6. P. 672–680.] <https://doi.org/10.1134/S1022795406060135>
19. Санников С.Н., Санникова Н.С., Петрова И.В. Очерки по теории лесной популяционной биологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 272 с.
20. Vendramin G.G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. № 4. P. 595–598.
21. Provan J., Powell W., Hollingsworth P.M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution // *Trends Ecol. Evol.* 2001. V. 16. № 3. P. 142–147. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02097-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02097-8)
22. Petit R.J., Excoffier L. Gene flow and species delimitation // *Trends Ecol. Evol.* 2009. V. 24. № 7. P. 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.02.011>
23. Birky C.W. Evolution and variation in plant chloroplast and mitochondrial genomes // *Plant evolutionary biol.*

- ogy / Gottlieb L., Jain S. Eds. L.: Chapman and Hall, 1988. P. 23–53.
24. Morgante M., Felice N., Vendramin G.G. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic bottleneck // Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals / Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. Eds. L.: Chapman and Hall, 1997. P. 402–412.
 25. Bucci G., Anzidei M., Madaghiele A., Vendramin G.G. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers // Mol. Ecol. 1998. V. 7. № 12. P. 1633–1643. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00466.x>
 26. Семерикова С.А., Семериков В.Л. Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихты *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt. // Генетика. 2007. Т. 43. № 12. С. 1637–1646. [Semerikova S.A., Semerikov V.L. The diversity of chloroplast microsatellite loci in Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.) and two Far East fir species *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. and *A. sachalinensis* Fr. Schmidt. // Rus. J. Genet. 2007. V. 43. № 12. P. 1373–1381.] <https://doi.org/10.1134/S102279540712006X>
 27. Vendramin G.G., Fady B., Gonzalez-Martinez S.C. et al. Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic mediterranean pine // Evolution. 2008. V. 62. № 3. P. 680–688. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00294.x>
 28. Potter K.M., Frampton J., Josseland S.A., Nelson C.D. Evolutionary history of two endemic Appalachian conifers revealed using microsatellite markers // Conservation Genetics. 2010. V. 11. № 4. P. 1499–1513. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9980-3>
 29. Semerikova S.A., Semerikov V.L., Lascoux M. Post-glacial history and introgression in *Abies* (Pinaceae) species of the Russian Far East inferred from both nuclear and cytoplasmic markers // J. Biogeogr. 2011. V. 38. № 2. P. 326–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02394.x>
 30. Semerikova S.A., Lascoux M., Semerikov V.L. Nuclear and cytoplasmic genetic diversity reveals long-term population decline in *Abies semenovii*, an endemic fir of Central Asia // Canad. J. Forest. Res. 2012. V. 42. № 12. P. 2142–2152. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2012-0158>
 31. Семериков В.Л., Семерикова С.А., Дымушак О.С. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Азии и Восточной Европе // Генетика. 2014. Т. 50. № 6. С. 660–669. [Semerikov V.L., Semerikova S.A., Dymshakova O.S. et al. Microsatellite loci polymorphism of chloroplast DNA of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Asia and eastern Europe // Rus. J. Genet. 2014. V. 50. № 6. P. 577–585.] <https://doi.org/10.1134/S1022795414040127> <https://doi.org/10.7868/S0016675814040122>
 32. Экарт А.К., Семерикова С.А., Семериков В.Л. и др. Изменчивость аллозимных и cpSSR маркеров в популяциях ели сибирской // Генетика. 2016. Т. 52. № 3. С. 311–319. [Ekart A.K., Semerikova S.A., Semerikov V.L. et al. Variability of allozyme and cpSSR markers in the populations of Siberian spruce // Rus. J. Genet. 2016. V. 52. № 3. P. 273–280.] <https://doi.org/10.1134/S1022795416030054> <https://doi.org/10.7868/S001667581603005X>
 33. Naydenov K.D., Naydenov M.K., Alexandrov A. et al. Ancient split of major genetic lineages of European black pine: evidence from chloroplast DNA // Tree Genetics & Genomes. 2016. V. 12. № 2. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1022-y>
 34. Kurt Y., Gonzalez-Martinez S.C., Alia R., Isik K. Genetic differentiation in *Pinus brutia* Ten. using molecular markers and quantitative traits: the role of altitude // Annals of Forest Science. 2012. V. 69. № 3. P. 345–351. <https://doi.org/10.1007/s13595-011-0169-9>
 35. Devey M.E., Bell J.S., Smith D.N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. № 6. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
 36. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. V. 41. P. 95–98.
 37. Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia University Press, 1987. 512 p.
 38. Goldstein D.B., Linares A.R., Cavallisforza L.L., Feldman M.W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci // Genetics. 1995. V. 139. № 1. P. 463–471.
 39. Excoffier L., Lischer H. ARLEQUIN ver. 3.5: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Bern: Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Ecology and Evolution, Univ. Bern, Bern, Switzerland, 2011. 174 p.
 40. Pons O., Petit R.J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles // Genetics. 1996. V. 144. № 3. P. 1237–1245.
 41. Rohlf E.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. N.Y.: Exter. Publ. LTD, 1988. 180 p.
 42. Mantel N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Res. 1967. V. 27. P. 209–220.
 43. Меншиков В.Л., Пешков В.М. Берег Пицунды: факты и гипотезы. М.: Мысль, 1980. 112 с.
 44. Moreno-Letelier A., Pinero D. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier // J. of Biogeogr. 2009. V. 36. № 1. P. 121–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02001.x>
 45. Коба В.П., Плуатарь Ю.В. К проблеме охраны природных популяций видов *Pinus* L. в Горном Крыму // Сборник научных трудов ГНБС. 2014. Т. 139. С. 5–14.
 46. Fraser D.J., Bernatchez L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units // Mol. Ecol. 2001. V. 10. № 12. P. 2741–2752. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.t01-1-01411.x>
 47. Kashirina E.S., Novikov A.A. Using of GIS for estimation of the recreational loads on natural protected areas // Proceedings of the International conference “InterCarto/InterGIS”. 2016. V. 22. № 2. P. 174–181. <https://doi.org/10.24057/2414-9179-2016-2-22-174-181>