

## Генетическая и фенотипическая изменчивость лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) на севере российского Дальнего Востока

Н. В. ОРЕШКОВА<sup>1,2</sup>, В. П. ВЕТРОВА<sup>3</sup>, Н. В. СИНЕЛЬНИКОВА<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28  
E-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru

<sup>2</sup> Сибирский федеральный университет  
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

<sup>3</sup> Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН  
683024, Петропавловск-Камчатский, просп. Рыбаков, 19-А  
E-mail: v.vetrova@mail.ru

<sup>4</sup> Институт биологических проблем Севера ДВО РАН  
685000, Магадан, ул. Портовая, 18  
E-mail: meks\_mag@mail.ru

Статья поступила 11.03.2014

Принята к печати 24.03.2014

### АННОТАЦИЯ

Исследование генетического и фенотипического разнообразия лиственницы Каяндера проведено на северо-востоке Азии – в Магаданской обл. и на полуострове Камчатка. Для анализа генетической изменчивости лиственницы использовали восемь ядерных микросателлитных локусов (*bcLK056*, *bcLK066*, *bcLK224*, *bcLK232*, *bcLK260*, *bcLK235*, *UAKLly6*, *UBCLXtet-1-22*). В качестве фенотипических маркеров брали характеристики формы семенных чешуй шишек, определенные с помощью методов геометрической морфометрии. Микросателлитный анализ выявил высокий уровень генетического разнообразия лиственницы Каяндера в районах крайнего Северо-Востока Азии. Значительные генетические и фенотипические различия между выборками лиственницы Каяндера из Магаданской обл. и Камчатки указывают на раннюю изоляцию лиственницы на полуострове. Во всех исследованных камчатских популяциях выявлен дефицит гетерозиготных генотипов, отражающий высокую степень инбридинга. В магаданских популяциях наблюдается избыток гетерозигот, что, вероятно, обусловлено действием балансирующего отбора в пользу гетерозигот.

**Ключевые слова:** лиственница Каяндера, микросателлитные локусы, фенотипические маркеры, генетическая изменчивость, популяционная структура.

Леса и редколесья из лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr) являются доминирующей формацией светлохвойной тайги на северо-востоке Азии. Вопросам географии и внутривидовой морфологической изменчиво-

сти лиственницы Каяндера в этом регионе посвящены многочисленные исследования. Однако генетическая изменчивость и популяционная структура *L. cajanderi* в северо-восточной части ареала до сих пор остаются

слабо изученными, а таксономический статус вида в этом регионе является предметом дискуссий.

На севере Дальнего Востока морфологическая изменчивость лиственницы Каяндера проанализирована в долине р. Кольма [Абаимов, Коропачинский, 1984; Синельникова, Пахомов, 2011]. Видовой статус лиственницы, произрастающей на полуострове Камчатка и в Магаданской обл., до сих пор остается спорным. В настоящее время принято относить эту лиственницу к виду *Larix cajanderi* Mayr. [Коропачинский, Встовская, 2002]. При исследовании эколого-географической изменчивости генеративных органов лиственниц в южной части российского Дальнего Востока, включая несколько выборок лиственницы Каяндера с Камчатки [Адрианова и др., 2011], показано, что островные и полуостровные популяции лиственницы (Курилы, Сахалин и Камчатка) объединяются в один кластер. Типичными для этих популяций являются признаки, описанные Е. Г. Бобровым [1972] для лиственницы камчатской (*Larix kamtschatica* (Rupr.) Carr), видовой статус которой в современной систематике не признан. Результаты генетических исследований лиственниц на крайнем Северо-Востоке и Камчатке говорят о довольно четкой их дифференциации. Отличия лиственницы с Камчатки от континентальных популяций отмечены при изучении генетической изменчивости ядерных микросателлитных маркеров в популяциях лиственницы сибирской Средней Сибири, Гмелина из Монголии [Орешкова и др., 2013]. Проведенный генетический анализ показал достоверность различий этих видов и более низкий уровень генетического разнообразия камчатских выборок лиственницы. Таксономический статус лиственницы Каяндера, произрастающей в верховьях Колымы, подтвержден по результатам изучения генетической изменчивости с помощью хлоропластных, митохондриальных и ядерных ДНК-маркеров [Абаимов и др., 2010; Семериков, Полежаева, 2007]. Изоферментный анализ выявил значительную дифференциацию лиственницы из Магаданской обл. [Абаимов и др., 2010; Орешкова, 2012]. В работе М. А. Полежаевой с соавт. [Polezhaeva et al., 2010], основанной на исследовании генетической из-

менчивости цитоплазматических маркеров, также отмечен обособленный характер камчатских популяций лиственницы по митохондриальным данным.

В качестве фенотипических маркеров для оценки внутри- и межвидовой дифференциации хвойных, в частности представителей рода *Larix*, успешно используются морфологические признаки генеративных органов, которые характеризуются высокой генетической детерминированностью. В этих исследованиях, как правило, анализируют комплекс морфологических признаков, включая характеристики размеров и индексы формы шишек, семян и семенных чешуй. Проблемой является корреляция признаков формы с характеристиками размеров генеративных органов, что не позволяет четко разделить факторы модификационной и генетической изменчивости хвойных. Кроме того, метрические признаки шишек зависят от локальных экологических факторов, а большая доля изменчивости признаков генеративных органов лиственниц (40–50 % вариации), считающихся таксономически значимыми (в том числе угол отклонения семенных чешуй шишек), на региональном уровне объясняется климатическими факторами среды [Адрианова и др., 2011]. Перспективным направлением является геометрическая морфометрия, которая основана на многомерном анализе координат меток, характеризующих форму объектов, и в отличие от классической морфометрии, дает возможность выявить различия между морфологическими объектами по форме, исключая “размерный фактор”, и получить визуализацию изменчивости формы объектов [Павлинов, Микешина, 2002; Zelditch et al., 2004]. Эффективность этого подхода для описания изменчивости формы семенных чешуй шишек и характеристики популяционной структуры хвойных продемонстрирована на примере кедрового стланика [Vetrova, 2013].

Цель исследования – провести сравнительный анализ генетической и фенотипической изменчивости лиственницы Каяндера в Магаданской обл. и на полуострове Камчатка, используя для генетического анализа ядерные микросателлиты, а для фенотипического – методы геометрической морфометрии формы семенных чешуй шишек.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Район исследований на Камчатке включает лиственничники равнинной и предгорной частей Центральной Камчатской депрессии и горные лиственничники восточного макросклона Срединного хребта, а в Магаданской обл. – горные лиственничные редколесья Колымского нагорья и южных отрогов хребта Черского и долинные лиственничные леса верховий Колымы (рис. 1, табл. 1).

По геоботаническому районированию Камчатки территория исследований относится к Центрально-Камчатской хвойно-лиственново-лесной провинции [Нешатаева, 2009]. Климат района умеренно-континентальный. Средняя часть террасированной долины р. Камчатка до высоты 300 м в этом районе занята лиственничными лесами с участием ели, в предгорьях распространены лиственнично-еловые леса, в понижениях рельефа встречаются эвтрофные болота и лиственничные мари

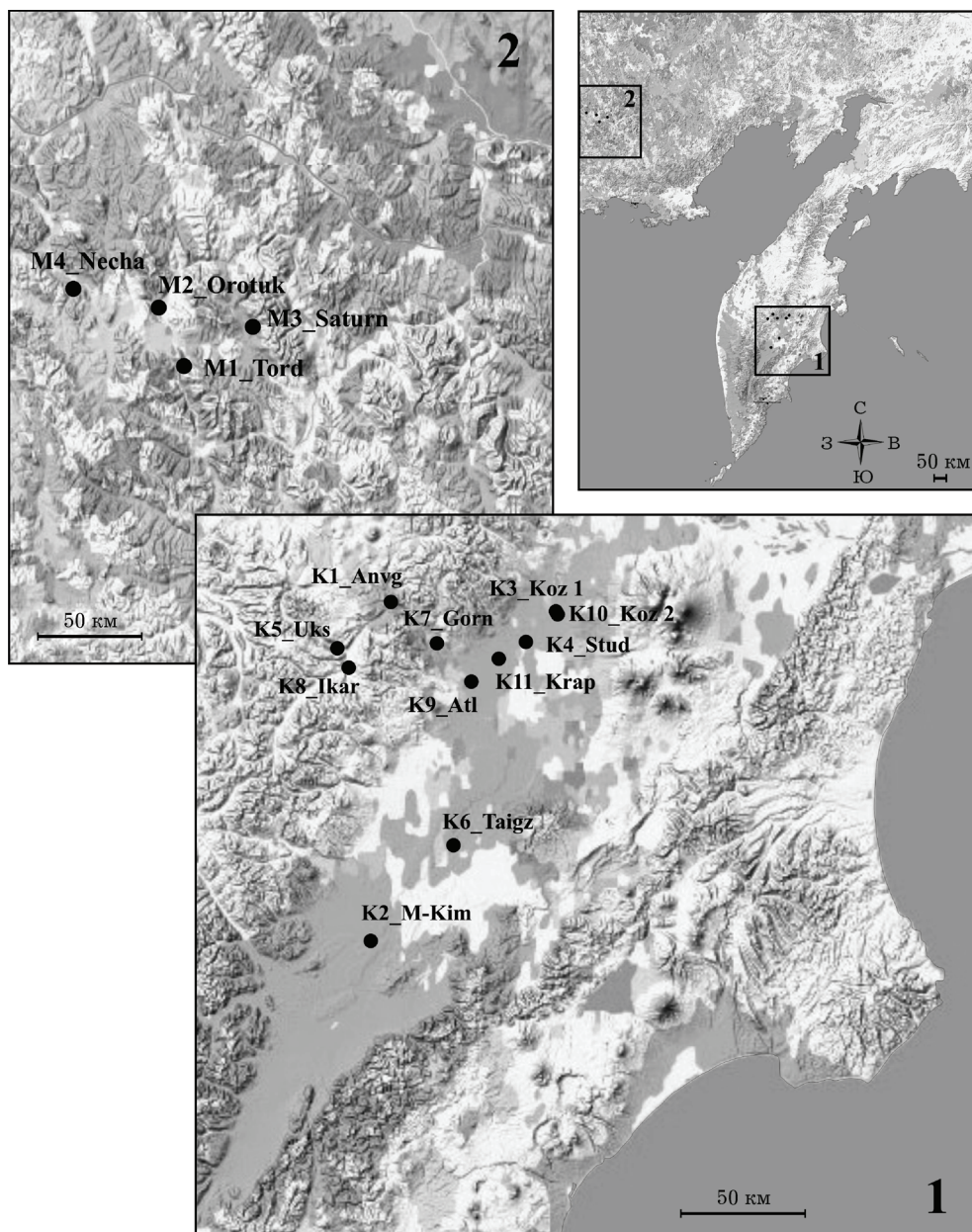


Рис. 1. Карта-схема размещения популяционных выборок лиственницы Каяндера в Камчатском крае и Магаданской обл.

## Характеристика исследованных ценопопуляций лиственницы Каандера

Код популяции	Географическое местоположение	Географические координаты	Ассоциация, условия произрастания
Магаданская обл.			
M1_Tord	Тенькинский р-н. Устье руч. Горелый в горном массиве Торданья (Гряда Малых порогов). Шлейф склона западной экспозиции, 5–7°. Высота над ур. м. 465 м	61°55' с. ш. 148°40' в. д.	<i>Laricetum cajanderi cladinosum</i>
M2_Orotuk	Тенькинский р-н, окрестности с. Оротук. Вторая надпойменная терраса р. Колыма вблизи впадения р. Бол. Ты-эллах. Высота над ур. м. 482 м	62°07' с. ш. 148°30' в. д.	<i>Laricetum pyroloso-hylocomiosum</i>
M3_Saturn	Тенькинский р-н, устье руч. Сатурн в горном массиве Бол. Анначаг. Шлейф склона ю-в экспозиции, крутизна 5–7°. Высота над ур. м. 850 м	62°03' с. ш. 149°09' в. д.	<i>Montano-Laricetum stereocaulo-vacciniosum</i>
M4_Necha	Тенькинский р-н. Устье р. Неча. Склон северной экспозиции, крутизна 20°. Высота над ур. м. 615 м	62°10' с. ш. 147°56' в. д.	<i>Cladolaricetum ledosi-sphagnosum</i>
Камчатский край			
K1_Anvg	Быстринский р-н, окрестности с. Анавгай, Срединный хребет, долина р. Анавгай, надпойменная терраса, нижняя часть склона восточной экспозиции. Высота над ур. м. 375 м	56°05' с. ш. 158°56' в. д.	<i>Laricetum cajanderi fruticoso-varioherbosum</i>
K2_M-Kim	Мильковский р-н, Центральная Камчатская депрессия, долина р. Мал. Кимитина. Высота над ур. м. 160 м	54°58' с. ш. 158°50' в. д.	<i>Sublaricetum calamagrostidosum</i>
K3_Koz1	Усть-Камчатский р-н, окрестности пос. Козыревск. Центральная Камчатская депрессия, надпойменная терраса р. Камчатка, урочище “Старая Камчатка”. Высота над ур. м. 40 м	56°03' с. ш. 159°54' в. д.	<i>Laricetum cajanderi cladinosum</i>
K4_Stud	Усть-Камчатский р-н, Центральная Камчатская депрессия, долина р. Студеная (урочище Куль). Высота над ур. м. 172 м	55°54' с. ш. 159°57' в. д.	<i>Laricetum cajanderi vaccinioso-cladinosum</i>
K5_Uks	Быстринский р-н, окрестности пос. Эссо. Восточный макросклон Срединного хребта, долина р. Уксичан. Пологий склон долинной морены северной экспозиции. Высота над ур. м. 515 м	55°56' с. ш. 158°38' в. д.	<i>Sublaricetum cajanderi uliginosi vacciniosum</i>
K6_Taigz	Мильковский р-н, окрестности пос. Таежный. Центральная Камчатская депрессия, первая надпойменная терраса р. Камчатка. Высота над ур. м. 158 м	50°17' с. ш. 159°19' в. д.	<i>Laricetum cajanderi fruticoso-varioherbosum</i>
K7_Gorn	Быстринский р-н, предгорья Быстринского хребта, долина р. Быстрая, урочище Горный Ключ. Высота над ур. м. 268 м	55°57' с. ш. 159°12' в. д.	<i>Laricetum cajanderi ledosum</i>
K8_Ikar	Быстринский район, восточный макросклон Срединного хребта, окрестности оз. Икар. Высота над ур. м. 556 м	55°52' с. ш. 158°41' в. д.	<i>Sublaricetum cajanderi uliginosi vacciniosum</i>
K9_Atl	Мильковский р-н, Центральная Камчатская депрессия, окр. пос. Атласово. Высота над ур. м. 90 м	55°49' с. ш. 159°25' в. д.	<i>Laricetum cajanderi ledosum vaccinietosum</i>
K10_Koz2	Усть-Камчатский р-н, окрестности пос. Козыревск. Центральная Камчатская депрессия. Высота над ур. м. 45 м	56°03' с. ш. 159°54' в. д.	<i>Laricetum cajanderi fruticoso-varioherbosum</i>
K11_Krap	Быстринский р-н, окрестности пос. Крапивная. Высота над ур. м. 220 м.	55°54' с. ш. 159°34' в. д.	Лиственничный молодняк на пепловых песках

П р и м е ч а н и е. Названия ассоциаций лиственничников приводятся в соответствии с фитоценотической классификацией В. Ю. Нешатаевой [2009] за исключением четырех выборок: *Laricetum pyroloso-hylocomiosum* (Povarnitsin, 1949), *Montano-Laricetum stereocaulo-vacciniosum* (Tulina, 1936), *Cladolaricetum ledosi-sphagnosum* (Tulina, 1936), *Sublaricetum calamagrostidosum* (Neshataev, 1974).

[Нешатаева, 2009]. На восточном макросклоне Срединного хребта до высоты 300 м распространены лиственничные леса (в основном багульниковые), на высоте от 500–600 до 700–800 м – лиственничные редколесья с подлеском из кедрового стланика.

Район исследований в Магаданской обл. по геоботаническому районированию Дальнего Востока относится к Колымско-Верхоянской континентальной провинции лиственничных редколесий Восточно-Сибирской подобласти светлохвойных лесов. Распространение светлохвойной лиственничной тайги в регионе связано с областью резко континентального и континентального климата. Рельеф преимущественно горный, представлен системой хребтов Колымского нагорья и отрогов хребта Черского. В среднем горном поясе развиты лиственнично-кедровостланиковые редины и редколесья, подгольцовый пояс представлен кедровостланиками и лиственнично-кедровостланиковыми рединами, занимающими склоны с 900 до 1200 м. Основная часть лесного пояса (450–900 м) и надпойменных террас занята лиственничными и лиственнично-кедровостланиковыми редколесьями. По долинам крупных рек в наиболее теплообеспеченных местообитаниях формируются высокобонитетные лиственничники долинных комплексов. Речные террасы, шлейфы склонов и межгорные понижения заняты лиственничными редколесьями и рединами, в различной степени заболоченными.

В Магаданской обл. выборки лиственницы для генетического и морфологического анализа сделаны в горных популяциях (см. табл. 1),

занимающих склоны разной экспозиции и крутизны. Одна выборка сделана в долинном лиственничнике на второй надпойменной террасе р. Колыма (M2\_Orotuk) в пределах Оротукской межгорной котловины.

Материалом для исследования послужили хвоя и шишки, собранные с 30 деревьев в каждой из 15 ценопопуляций в период с 2010 по 2012 г. Для генетических исследований лиственницы индивидуальные препараты тотальной ДНК выделялись из хвои. Выделения проводили по протоколу для растительных тканей с применением СТАВ-метода [Devey et al., 1996]. Для фенотипических исследований применялся метод геометрической морфометрии семенных чешуй шишек.

Анализ генетического полиморфизма лиственницы Каяндера проводили с использованием восьми ядерных микросателлитных локусов (табл. 2).

Для проведения реакции амплификации использовались наборы для ПЦР GenePak® PCR Core (ООО “Лаборатория Изоген”). Амплифицированные фрагменты разделяли в 6%-м полиакриламидном геле с использованием Трис-EDTA-боратного электродного буфера. Гели окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали с помощью системы гель-документации. Оценку показателей генетического разнообразия проводили с помощью программы GenAlEx 6.41 [Peakall, Smouse, 2006]. Кластеризацию по методу невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) и по методу ближайшего связывания (Neighbor Joining или NJ-метод) с оценкой бутстреп-поддержки узлов ветвления проводили в

Т а б л и ц а 2

Характеристика микросателлитных локусов, отобранных для анализа генетической изменчивости лиственницы Каяндера

Локус	Мотив	Температура отжига, °С	Размер фрагмента	Источник литературы
bcLK056	(AG) <sub>20</sub>	Touchdown	174–200	Isoda, Watanabe, 2006
bcLK066	(TG) <sub>12</sub>	63–53	155–172	
bcLK224	(AG) <sub>17</sub>		152–168	
bcLK260	(TG) <sub>14</sub> (AG) <sub>9</sub>		115–126	
bcLK235	(TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>2</sub> AG(AC) <sub>14</sub>	58	177–220	
UBCLXtet-1-22	(TATC) <sub>9</sub> (TA) <sub>12</sub>		175–250	Chen et al., 2009
UAKLly6	(GT) <sub>17</sub>		214–264	Khasa et al., 2000; Isoda, Watanabe, 2006
bcLK232	(AG) <sub>19</sub>	Touchdown	142–178	Isoda, Watanabe, 2006
		63–53		

модулях Neighbor и Consense пакета программ PHYLIP v 3.2 [Felsenstein, 1989] и в программе STATISTICA-8 [Statsoft, 2007].

В качестве фенотипических маркеров для анализа популяционной изменчивости листовницы мы использовали относительные деформации семенных чешуй шишек, определенные методами геометрической морфометрии. При описании изменчивости формы семенных чешуй применяли методические указания по геометрической морфометрии, изложенные в обзорной статье И. Я. Павлинова и Н. Г. Микешинной [2002] и в монографии М. Zelditch с соавт. [2004]. Фенотипический анализ выполнен в одиннадцати выборках, включая четыре магаданские выборки и семь выборок с полуострова Камчатка. По контуру чешуй наносили метки, используя угловой алгоритм, который предварительно определялся по средним значениям положения характерных точек изгиба чешуй (рис. 2).

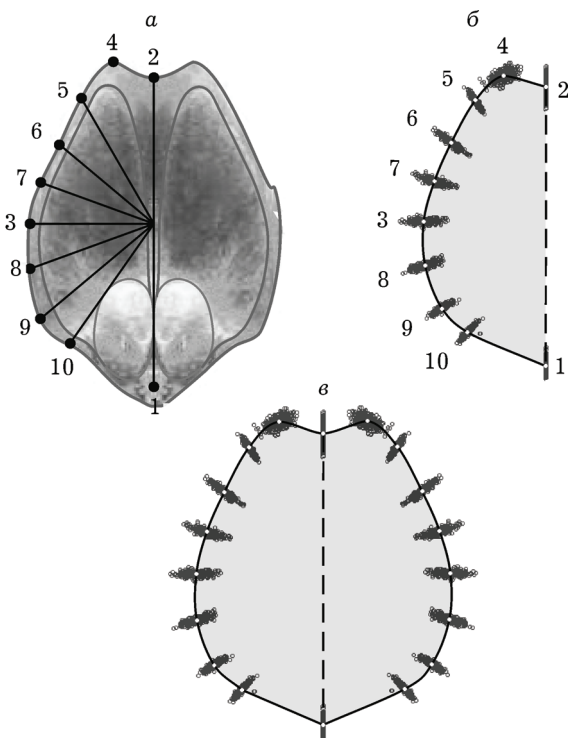


Рис. 2. Геометрическая морфометрия семенных чешуй листовницы Каяндера. Показана расстановка меток (а); визуализация результатов совмещения выборки чешуй из 11 ценопопуляций ( $N = 328$ ) со средней конфигурацией методом скользящей базовой линии (б); для получения полного изображения чешуй выполнено дублирование и отражение координат меток от оси симметрии (в)

Метки наносили с внутренней стороны чешуй, что позволяет более точно определить положение оси симметрии по отпечаткам крылаток семян. Семенные чешуи относятся к билатерально симметричным структурам, поэтому для характеристики их формы выбирали 10 меток на одной стороне чешуй (см. рис. 2, а). Метки 1 и 2 ставились на оси симметрии у основания и верхушки чешуй (см. рис. 2), метка 3 – в точке пересечения боковой линии чешуй с линией, проведенной перпендикулярно оси симметрии из ее центра, метка 4 соответствует точке изгиба оттянутой верхушки чешуй. Остальные метки (5–10) расставлены в соответствии с угловым алгоритмом из середины оси симметрии под углом 30, 50, 70, 110, 130 и 145 градусов соответственно (см. рис. 2, а). Расстановку меток и определение их координат выполняли на сканированных изображениях чешуй с помощью экранного дигитайзера TPSDig [Rolf, 2010]. Исходные координаты меток нормировали с помощью Прокрустова совмещения выборки чешуй со средней конфигурацией в программе CoordGen6 [Sheets, 2001]. Обработку и анализ данных проводили с использованием пакета IMP-программ (Integrated Morphometrics Programms). При визуализации результатов анализа для получения полного изображения чешуй использовали дублирование и отражение от оси симметрии координат меток, полученных на одной стороне чешуй, методом скользящей базовой линии (SBR – sliding baseline registration), который исключает вращение оси симметрии морфологических структур (см. рис. 2, б, в).

Достоверность различия популяций по форме семенных чешуй определяли при парном сравнении выборок в программе Two-Group6h по критерию Гудолла (Goodall'test) для частных Прокрустовых расстояний с использованием бутстрэп-ресамплинга [Sheets, 2001]. Прокрустово расстояние используется в геометрической морфометрии как метрика – общая мера различий при сравнении форм [Павлинов, Микешина, 2002; Zelditch et al., 2004] и определяется как сумма квадратов разности между координатами меток сравниваемых морфологических объектов по всей совокупности меток. Кластерный анализ матрицы Прокрустовых расстояний выполнялся для оценки дифференциации

выборки на веб-сервере T-REX [Boc et al., 2012], используя алгоритм взвешенных наименьших квадратов [Makarenkov, Leclerc, 1999]. Ординация выборок получена с использованием метода многомерного неметрического шкалирования матрицы Прокрустовых расстояний в программе STATISTICA-8 [Statsoft, 2007]. Основные направления изменчивости формы чешуй выявляли с помощью анализа главных компонент значений частных деформаций чешуй (включая однородные линейные изменения) в программе PCAGen6n [Sheets, 2001]. Полную матрицу значений относительных деформаций чешуй, полученных в программе PCAGen6n, использовали для оценки популяционной и экологической изменчивости лиственницы с помощью многомерного дисперсионного анализа ANOVA и PLS-анализа (анализа частных наименьших квадратов) в программе STATISTICA-8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Генетическая изменчивость лиственницы Каяндера.** В процессе исследования 8 ядерных микросателлитных локусов в 15 популяциях лиственницы Каяндера из различных районов естественного распространения в Камчатском крае и Магаданской обл. выявлено 54 аллельных варианта, 25 (46,3 %) которых являются общими. У изученных нами популяций идентифицированные микросателлитные локусы существенно отличались по составу и частотам встречаемости выявленных аллелей. Так, например, в популяциях лиственницы Каяндера из Магаданской обл. обнаружено 18 специфичных аллелей, а в популяциях из Камчатского края – только 9. В целом аллельное разнообразие в магаданских популяциях выше – 43 аллеля, тогда как в камчатских популяциях – 36 аллелей. Стоит отметить, что у лиственницы Каяндера в Камчатском крае локус *bcLK232* оказался мономорфным, а в магаданских популяциях у этого локуса выявлены три аллеля.

Для выявления и исключения возможных вариантов ошибок генотипирования микросателлитных локусов использовалась программа MICRO-CHECKER [Van Oosterhout et al., 2004]. При помощи данной программы провели оценку частот возможных нуль-аллелей в

локусах и скорректировали число гомозиготных генотипов, а также частоту амплифицированных аллелей в популяциях. Частоты скрытых нуль-аллелей рассчитывались исходя из предположения о том, что популяции находятся в равновесном состоянии, согласно правилу Харди – Вайнберга.

Расчеты основных параметров генетической изменчивости (табл. 3) показали, что лиственница Каяндера из районов Камчатки менее генетически изменчива ( $N_A = 3,489$ ;  $N_E = 2,030$ ;  $H_O = 0,383$ ;  $H_E = 0,440$ ) по сравнению с изученными выборками лиственницы из Магаданской обл. ( $N_A = 4,531$ ;  $N_E = 2,624$ ;  $H_O = 0,528$ ;  $H_E = 0,523$ ).

В целом значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о высоком среднем уровне генетического разнообразия ( $N_A = 3,767$ ;  $N_E = 2,191$ ;  $H_O = 0,422$ ;  $H_E = 0,463$ ) пятнадцати популяций лиственницы Каяндера в исследованных нами районах (см. табл. 3) и близки к аналогичным показателям, приведенным в работах для *L. lyallii* и *L. occidentalis* [Khasa et al., 2000; Chen et al., 2009], *L. kaempferi* [Isoda, Watanabe, 2006], *L. sibirica*, *L. gmelinii* и *L. cajanderi* [Орешкова и др., 2013].

Во всех изученных популяциях лиственницы Каяндера из Камчатки выявлен дефицит гетерозиготных генотипов ( $F = 0,138$ ). В популяциях лиственницы из Магадана, напротив, выявлен избыток гетерозигот ( $F = -0,029$ ).

В среднем, как показал анализ популяционной структуры вида с помощью  $F$ -статистик Райта [Guries, Ledig, 1982], каждое дерево в изученных популяциях *L. cajanderi* обнаруживает почти 7%-ный дефицит гетерозиготных генотипов ( $F_{IS} = 0,068$ ) относительно популяции и почти 17%-ный дефицит гетерозигот ( $F_{IT} = 0,176$ ) относительно вида в целом (табл. 4).

Около 12 % всей наблюдаемой изменчивости приходится на межпопуляционную ( $F_{ST} = 0,117$ ). Внутри популяций сосредоточено 88,3 % всего генетического разнообразия. Максимально популяции дифференцированы по локусам *bcLK066*, *bcLK056*, *bcLK235*. Следует отметить, что наибольший вклад в установленное нами значение показателя  $F_{ST}$  вносят популяции лиственницы Каяндера из Камчатского края ( $F_{ST} = 0,039$ ) (табл. 5).

Т а б л и ц а 3

## Показатели генетической изменчивости лиственниц, рассчитанные по результатам микросателлитного анализа

Популяция	$N$	$N_A$	$N_E$	$H_O$	$H_E$	$F$
Камчатский край						
K1_Aavg	29	3,375	1,908	0,362	0,433	0,153
K2_M-Kim	28	4,000	2,266	0,446	0,475	0,048
K3_Koz1	30	3,125	1,929	0,317	0,422	0,298
K4_Stud	30	3,875	2,062	0,375	0,458	0,191
K5_Uks	30	3,500	2,097	0,396	0,462	0,159
K6_Taigz	30	3,500	2,090	0,404	0,451	0,116
K7_Gorn	30	3,500	2,036	0,413	0,433	0,055
K8_Ikar	30	3,500	2,231	0,429	0,474	0,109
K9_Atl	30	3,500	1,960	0,371	0,424	0,120
K10_Koz2	30	2,875	1,823	0,333	0,393	0,130
K11_Krap	30	3,625	1,967	0,371	0,423	0,137
В среднем для камчатских популяций		$3,489 \pm 0,141$	$2,030 \pm 0,075$	$0,383 \pm 0,021$	$0,440 \pm 0,023$	$0,138 \pm 0,011$
Магаданская обл.						
M1_Tord	30	4,875	2,837	0,538	0,535	-0,014
M2_Orotuk	30	4,500	2,747	0,538	0,526	-0,054
M3_Saturn	30	4,375	2,576	0,542	0,519	-0,065
M4_Necha	30	4,375	2,337	0,496	0,513	0,016
В среднем для магаданских популяций		$4,531 \pm 0,246$	$2,624 \pm 0,225$	$0,528 \pm 0,039$	$0,523 \pm 0,040$	$-0,029 \pm 0,026$
В среднем для всех изученных популяций		$3,767 \pm 0,129$	$2,191 \pm 0,085$	$0,422 \pm 0,020$	$0,463 \pm 0,020$	$0,089 \pm 0,014$

П р и м е ч а н и е.  $N$  – число деревьев в выборке,  $N_A$  – среднее число аллелей на локус,  $N_E$  – эффективное число аллелей на локус,  $H_O$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $F$  – индекс фиксации,  $\pm$  – стандартная ошибка.

Т а б л и ц а 4

Значения показателей  $F$ -статистик Райта

Локус	Число аллелей	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
bcLK056	10	0,086	0,237	0,166
bcLK224	7	0,087	0,158	0,078
bcLK066	8	0,070	0,369	0,322
bcLK260	7	0,105	0,194	0,099
bcLK235	9	0,093	0,211	0,130
UAKLly6	5	0,124	0,185	0,069
UBC-1-22	5	0,011	0,059	0,048
bcLK232	3	-0,032	-0,006	0,025
Среднее		$0,068 \pm 0,018$	$0,176 \pm 0,040$	$0,117 \pm 0,033$

П р и м е ч а н и е.  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга особи относительно популяций,  $F_{IT}$  – коэффициент инбридинга особи относительно вида,  $F_{ST}$  – коэффициент инбридинга популяций относительно вида в целом.



Значения показателей F-статистик Райта, рассчитанные отдельно по каждому из изученных районов

Локус	Камчатские популяции			Магаданские популяции		
	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
<i>bcLK056</i>	0,109	0,134	0,028	0,017	0,078	0,062
<i>bcLK224</i>	0,152	0,213	0,072	-0,099	-0,094	0,005
<i>bcLK066</i>	0,134	0,156	0,025	-0,124	-0,117	0,007
<i>bcLK260</i>	0,134	0,167	0,038	0,049	0,119	0,074
<i>bcLK235</i>	0,076	0,100	0,026	0,125	0,148	0,026
<i>UAKLly6</i>	0,140	0,192	0,060	0,073	0,089	0,017
<i>UBC-1-22</i>	0,201	0,219	0,023	-0,254	-0,244	0,008
<i>bcLK232</i>	-	-	-	-0,032	-0,023	0,009
Среднее	0,135 ± 0,014	0,169 ± 0,015	0,039 ± 0,007	-0,031 ± 0,044	-0,005 ± 0,049	0,026 ± 0,010

Количественная оценка степени генетических различий ( $D_N$ ) между исследованными популяциями установлена на основании частот аллелей восьми ядерных микросателлитных локусов [Nei, 1972]. Из приведенных в табл. 6 данных видно, что значения генетических расстояний ( $D_N$ ) между популяциями лиственницы варьируют в достаточно широких пределах: от 0,004 до 0,458. Выявленные значения  $D_N$  показали четкую корреляцию с географическими дистанциями согласно тесту Мантела ( $r = 0,981$ ,  $p = 0,01$ ).

Построенная на основе матрицы генетических дистанций UPGMA-дендрограмма (см. рис. 3) достаточно четко иллюстрирует группировку исследованных популяций лиственниц Каяндера из Камчатского края и Магаданской обл.

На дендрограмме четко выделяются две группы популяций. В первую группу с бутстреп-поддержкой в 100 % вошли все камчатские популяции. Генетическое расстояние между ними составило в среднем 0,036. Второй кластер объединил популяции лиственницы из Магаданской обл. ( $D_N = 0,051$ ), также с бутстреп-поддержкой в 100 %. Между этими кластерами наблюдаются достаточно серьезные различия по составу и частотам исследованных ядерных микросателлитных локусов. Генетическая дистанция между ними составляет 0,362 (см. табл. 6), что отражает значительную генетическую дифференциацию камчатских и магаданских выборок. Образованные внутри камчатского кластера группы с невысокими индексами бутстрепа

говорят о том, что лиственница Каяндера в данном регионе генетически неоднородна, на что существенное влияние оказывает экологическая гетерогенность среды.

Таким образом, использование восьми ядерных микросателлитных локусов позволило получить оценки уровня генетического разнообразия и дифференциации лиственницы Каяндера из Камчатского края и Магаданской обл. Установлено, что магаданские популяции лиственницы существенно отличаются от камчатских как по уровню генетического разнообразия, так и по генетической структуре. Полученные результаты о значительной дифференциации лиственницы из Магаданской обл. и Камчатского края согласуются с данными, полученными по другим генетическим маркерам [Абаимов и др., 2010; Орешкова, 2012; Polezhaeva et al., 2010].

**Фенотипическая изменчивость лиственницы Каяндера.** Основные направления индивидуальной изменчивости формы семенных чешуй лиственницы Каяндера на полуострове Камчатка и Колымском нагорье по результатам анализа главных компонент значений частных деформаций формы чешуй показаны на рис. 4. Выделено пять главных компонент изменчивости формы чешуй, характеризующие 92,3 % общей дисперсии. Наибольшая изменчивость формы чешуй (55,5 % общей дисперсии) связана с варьированием ширины и длины чешуй (см. рис. 4 а, б), выделяемых первой главной компонентой. Вторая главная компонента (15,5 % общей дисперсии) характеризует изменчивость сужения



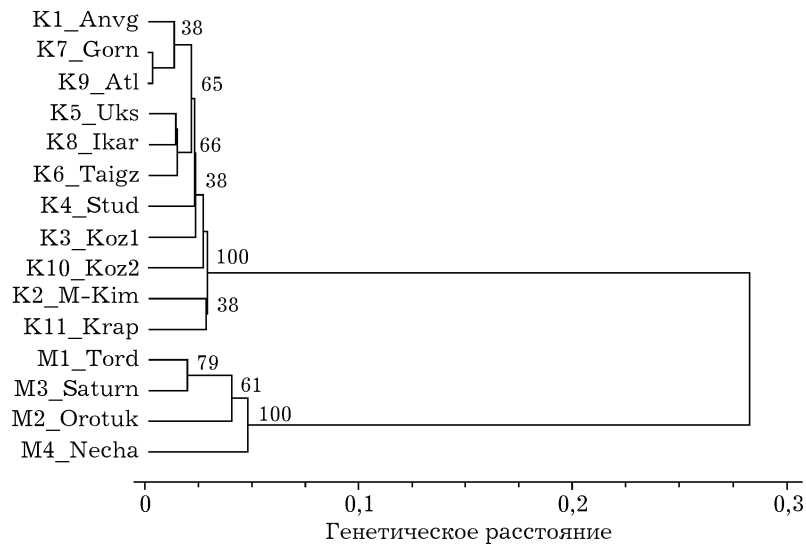


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма генетических расстояний между изученными популяциями лиственниц, построенная на основании SSR-анализа. Значения бутстрепа приведены при соответствующих узлах ветвления

верхней части чешуй, согласованную с расширением их нижней части (см. рис. 4, в, з). Третья компонента (13,4 % общей дисперсии) напротив, характеризует изменчивость формы, связанную главным образом с одновременным расширением или сужением и верхней и нижней частей чешуй (см. рис. 4, д, е). Четвертая компонента (5,1 % общей диспер-

сии) описывает изменчивость конфигурации формы слабовеячатых овальных чешуй (см. рис. 4, ж, з), а пятая компонента (3,4 % общей дисперсии) связана главным образом с вариацией формы верхнего края чешуй по глубине выемки (см. рис. 4, и, к).

Ординация одиннадцати популяционных выборок лиственницы Каяндера на плоскости

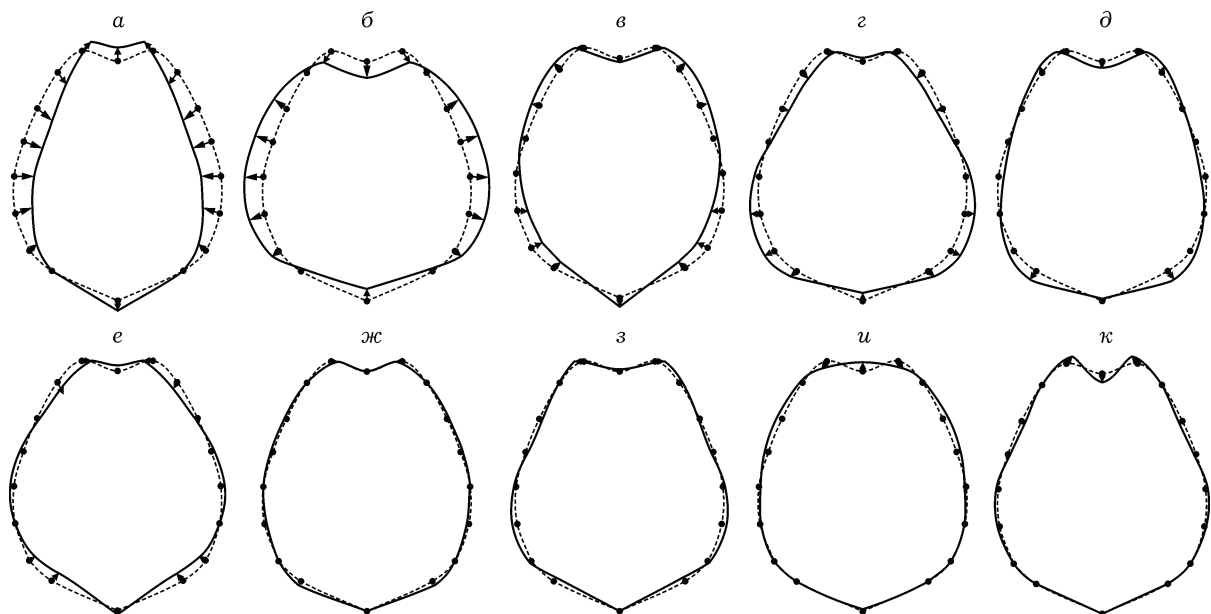


Рис. 4. Направления изменчивости формы семенных чешуй лиственницы Каяндера по результатам PCA-анализа выборки чешуй с 328 растений из 11 ценопопуляций. Стрелками показаны изменения положения меток средней конфигурации чешуй в соответствии с минимальными и максимальными значениями пяти главных компонент

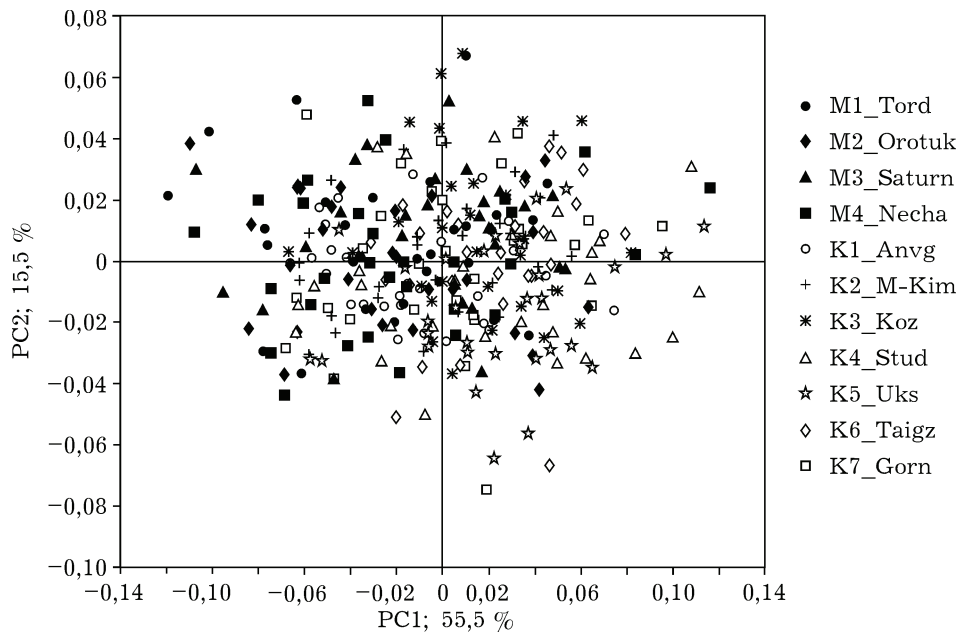


Рис. 5. Ординация популяционных выборок лиственницы Каяндера по результатам анализа главных компонент частных деформаций формы семенных чешуй ( $N = 328$ )

двух первых главных компонент изменчивости формы семенных чешуй показана на рис. 5.

Магаданские выборки лиственницы преобладают в области отрицательных значений по PC1 (см. рис. 5), что соответствует удлинненным чешуям узко-овальной формы (см. рис. 4, а). Камчатские выборки доминируют в области положительных значений PC1, что соответствует округлой форме чешуй шишек (см. рис. 4, б). Значения главных компонент, относительные деформации формы чешуй, мы использовали в качестве фенотипических маркеров при оценке популяционной изменчивости лиственницы. По результатам дисперсионного анализа межпопуляционная изменчивость относительных деформаций чешуй составляет 12 %, а внутривидовая — 88 %. В камчатских выборках отмечена более высокая межпопуляционная изменчивость формы семенных чешуй по сравнению с магаданскими популяциями: на Камчатке этот показатель составляет 9,3 %, а в Магаданской обл. — 4 %. Данные по соотношению внутри- и межпопуляционной фенотипической изменчивости лиственницы согласуются с данными коэффициента  $F_{ST}$ , отражающего степень подразделенности популяций, приведенными в табл. 4 и 5.

Фенотипические (Прокрустовы) расстояния варьируют от 0,0107 (между выборками с надпойменной террасы р. Камчатка K3-Koz1 и K6-Taigz) до 0,0516 (между камчатской выборкой из среднегорья Срединного хребта K5\_Uks и магаданской выборкой M1-Tord с горного массива Торданья). Ординация выборок по результатам многомерного шкалирования матрицы Прокрустовых расстояний показана на рис. 6, а. Хорошо дифференцированы камчатские и магаданские выборки, кроме того, значительная дифференциация наблюдается между камчатскими популяциями лиственницы (см. рис. 6, а). Эти результаты согласуются с данными по фенотипической дифференциации выборок лиственницы, полученные кластерным анализом матрицы Прокрустовых расстояний (см. рис. 6, б). По результатам кластерного анализа выделяются две группы фенотипически различных выборок лиственницы: камчатская и магаданская (см. рис. 6). В первую группу входят пять камчатских выборок: три популяции долинных лиственничников из Центральной Камчатской депрессии (ЦКД), выборка из среднегорья Срединного хребта (K5\_Uks) и выборка с предгорья Быстринского хребта (K7-Gorn). В магаданскую группу входят популяции горных лиственничников Колымско-

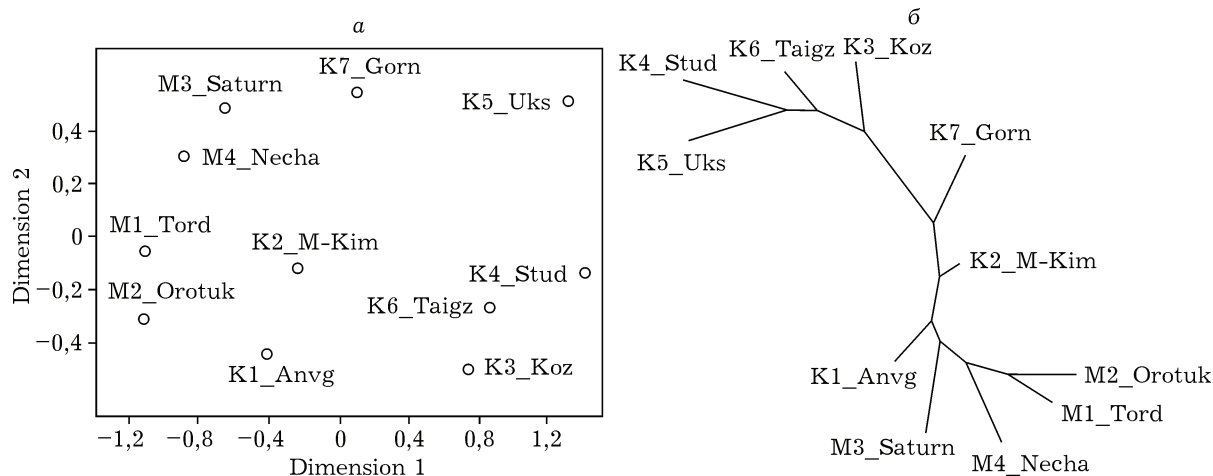


Рис. 6. Фенотипическая дифференциация выборок лиственницы Каяндера: а – ординация выборок по результатам многомерного шкалирования матрицы Прокрустовых расстояний; б – радиальная WM-дендрограмма сходства популяций, полученная кластерным анализом матрицы расстояний по методу взвешенных наименьших квадратов

го нагорья, с ними фенотипически сходны две камчатские выборки – с надпойменной террасы реки Анавгай восточного макросклона Срединного хребта (K1\_Aavg) и из заболоченного редколесья лиственницы в Центральной Камчатской депрессии (K2\_M-Kim).

На фенотипическую дифференциацию популяций лиственницы влияют географические факторы. По результатам PLS-анализа относительных деформаций чешуй выделяется одна статистически значимая главная компонента ( $p < 0,01$ ), с факторными нагрузками широты ( $r = +0,97$ ), долготы ( $r = -0,97$ ) и высоты мест произрастания ( $r = +0,89$ ). Это отражает фенотипические различия выборок лиственницы Каяндера из горных и долинных лесных комплексов Магаданской обл. и Камчатского края, выявленные кластерным анализом матрицы Прокрустовых расстояний.

При анализе полных матриц генетических и фенотипических расстояний выявлена положительная корреляция между ними ( $r = +0,35$ ,  $p < 0,01$ ). Это свидетельствует о взаимосвязи генетической и фенотипической популяционных структур лиственницы и подтверждает генетическую детерминированность использованных фенотипических маркеров. Факт зависимости изменчивости фенотипических маркеров от географических факторов также согласуется с тем, что форма чешуй контролируется генетически. Более

высокая межпопуляционная изменчивость формы чешуй в камчатских выборках по сравнению с магаданскими совпадает с данными по более высокой межпопуляционной генетической изменчивости лиственницы на Камчатке. Таким образом, снижение фенотипического разнообразия внутри камчатских популяций лиственницы Каяндера в определенной степени компенсируется увеличением межпопуляционной изменчивости. Подобное явление отмечено В. П. Путенихиным [2003] в популяциях лиственницы Сукачева на Урале. Можно предположить, что в эволюционном отношении факторы дифференциации на межпопуляционном уровне интенсифицированы на Камчатке в большей степени, чем микроэволюционные процессы в пределах популяций в отличие от крайнего северо-востока Азии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка разнообразия и популяционной структуры лиственницы Каяндера с использованием ядерных микросателлитных маркеров и фенотипических маркеров выявила высокий уровень изменчивости и дифференциации популяций на севере Дальнего Востока. Наиболее высокий уровень внутривидового полиморфизма и по генетическим, и по фенотипическим маркерам обнаружен у популяций лиственницы Каяндера в Магадан-

ской обл. Значительные генетические различия между выборками лиственницы из Магаданской обл. и Камчатского края указывают на раннюю изоляцию лиственницы на полуострове Камчатка. Во всех исследованных камчатских популяциях выявлен дефицит гетерозиготных генотипов, отражающий высокую степень инбридинга. В магаданских популяциях наблюдается избыток гетерозигот, что, вероятно, обусловлено действием балансирующего отбора в пользу гетерозигот. В магаданских выборках отмечена более высокая внутривидовая генетическая изменчивость и низкий уровень межвидовых различий по сравнению с камчатскими популяциями. Это обусловлено, вероятно, различиями в микроэволюционных процессах и расселении лиственницы Каяндера в приокеанических районах и в континентальных районах крайнего северо-востока Азии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 11-04-00478-а).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Абаимов А. П., Адрианова И. Ю., Артюкова Е. В. и др. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России. Новосибирск: "ГЕО", 2010. 160 с.
- Абаимов А. П., Коропачинский И. Ю. Лиственницы Гмелина и Каяндера. Новосибирск, 1984. 121 с.
- Адрианова И. Ю., Васюткина Е. А., Крестов П. В. Эколого-географическая изменчивость генеративных органов лиственницы на российском Дальнем Востоке // Экология. 2011. Т. 42, № 1. С. 9–16.
- Бобров Е. Г. История и систематика лиственниц. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1972. 96 с.
- Коропачинский И. Ю., Встовская Т. Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002. 707 с.
- Нешатаева В. Ю. Растительность полуострова Камчатка. М.: КМК, 2009. 537 с.
- Орешкова Н. В. Генетическая дифференциация Сибирских видов лиственниц по данным изоферментного анализа // Растительный мир Азиатской России. 2012. № 2(10). С. 33–42.
- Орешкова Н. В., Белоконов М. М., Жамъянсунен С. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // Генетика. 2013. Т. 49, № 2. С. 204–213.
- Павлинов И. Я., Микешина Н. Г. Принципы и методы геометрической морфометрии // Журн. общ. биологии. 2002. Т. 63, № 6. С. 473–493.
- Путенихин В. П. Микроэволюционные аспекты внутривидовой дифференциации лиственницы Сукачева на Урале // Хвойные бореальной зоны. 2003. Вып. 1. С. 21–27.
- Семериков В. Л., Полежаева М. А. Структура изменчивости митохондриальной ДНК лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока // Генетика. 2007. Т. 43, № 6. С. 782–789.
- Синельникова Н. В., Пахомов М. Н. Морфологическая изменчивость лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) в Оротукской котловине (долина р. Кольма) // Turczaninowia. 2011. № 14(3). С. 62–68.
- Вос А., Diallo Alpha B., Makarenkov V. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40, N 1. P. 573–579.
- Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T. et al. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) // Molecular Ecol. Resources. 2009. Vol. 9. P. 843–845.
- Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. Vol. 92, N 6. P. 673–679.
- Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2) // Cladistics. 1989. Vol. 5. P. 164–166.
- Guries R. P., Ledig F. T. Gene diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. 1982. Vol. 36. P. 387–402.
- Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Molecular Ecol. 2006. Vol. 6. P. 664–666.
- Khasa D. P., Newton C. H., Rahman M. H. et al. Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch // Genome. 2000. N 43 (3) P. 439–448.
- Makarenkov V., Leclerc B. An algorithm for the fitting of a tree metric according to a weighted least-squares criterion // J. Classif. 1999. Vol. 16. P. 3–27.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. Vol. 106. P. 283–291.
- Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecol. Notes. 2006. Vol. 6, N 1. P. 288–295.
- Polezhaeva M. A., Lascoux M., Semerikov V. L. Cytoplasmic DNA variation and biogeography of *Larix Mill.* in Northeast Asia // Molecular Ecol. 2010. Vol. 19. P. 1239–1252.
- Rohlf F. J. Programs tpsDig, version 2.16, tps Utility, version 1.47. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook, <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. 2010.
- Sheets H. D. Integrated Morphometrics Programs. Dept. of Physics, Canisius College, Buffalo NY, <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>. 2001.
- StatSoft Inc., STATISTICA Data Analysis Software System, Version 8.0, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). 2007.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Molecular Ecol. Notes. 2004. N 4. P. 353–358.
- Vetrova V. P. Geometric Morphometric Analysis of Shape Variation in the Cone-Scales of *Pinus pumila* (Pall.)

## Genetic and Phenotypic Diversity of Cajanderi Larch (*Larix cajanderi* Mayr) in the North of the Russian Far East

N. V. ORESHKOVA<sup>1,2</sup>, V. P. VETROVA<sup>3</sup>, N. V. SINELNIKOVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Sukachev Institute of Forest SB RAS  
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28  
E-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru

<sup>2</sup>Siberian Federal University  
660041, Krasnoyarsk, Svobodny ave., 79

<sup>3</sup> Kamchatka Branch of Pacific Geographical Institute, FEB RAS  
683024, Petropavlovsk-Kamchatsky, Rybakov ave., 19-A  
E-mail: v.vetrova@mail.ru

<sup>4</sup> Institute of Biological Problems of the North FEB RAS  
685000, Magadan, Portovaya str., 18  
E-mail: meks\_mag@mail.ru

The study of genetic and phenotypic diversity of Cajanderi larch was carried out in the north-east of Asia – in the Magadanskaya Oblast and on the Kamchatka Peninsula. Genetic diversity of the larch was investigated using eight nuclear microsatellite loci (*bcLK056*, *bcLK066*, *bcLK224*, *bcLK232*, *bcLK260*, *bcLK235*, *UAKLly6*, *UBCLXtet-1-22*). Phenotypic diversity was estimated using shape characteristics of the cone-scales determined by methods of geometric morphometrics. The microsatellite analysis revealed high level of genetic diversity of *L. cajanderi* in the Far North of Asia. Significant genetic and phenotypic differences between *L. cajanderi* samples from the Magadanskaya Oblast and Kamchatka suggested early isolation of the larch on the peninsula. Deficiency of heterozygote genotypes was detected in all investigated larch populations in Kamchatka, which related to high degree of inbreeding. Excess of heterozygote genotypes was observed in the Magadan populations of *L. cajanderi*, which was probably due to the balancing selection in favor of heterozygotes.

**Key words:** Cajanderi larch, microsatellite loci, phenotypic markers, genetic variation, population structure.