

УДК 630×165.3: 630\*17:582.475.4

## О ВЫБОРКАХ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ВНУТРИВИДОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2014 г. И. В. Тихонова<sup>1</sup>, В. Л. Семериков<sup>2</sup>,  
С. А. Семерикова<sup>2</sup>, О. С. Дымшакова<sup>2</sup>, К. Г. Зацепина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

<sup>2</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН  
620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

E-mail: selection@ksc.krasn.ru, semerikov@ipae.uran.ru, s.a.semerikova@ipae.uran.ru,  
dymshakova@rambler.ru, kseniya-zacepina@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.2014 г.

Исследовано влияние величины выборки на результаты оценок генетического разнообразия популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) по изменчивости 12 полиморфных локусов изоферментов и четырех микросателлитных локусов (срSSR). Установлено, что увеличение выборки до 100 деревьев и более на популяцию приводит к существенному увеличению показателей как аллозимного разнообразия (по числу аллелей и генотипов), так и разнообразия гаплотипов хлоропластной ДНК (микросателлитных локусов срSSR), к сокращению межпопуляционных генетических дистанций  $N_{ei}$  без существенного изменения параметров, характеризующих генетическую структуру вида. Стандартные объемы выборок позволяют адекватно оценить популяционную генетическую структуру вида, но недостаточны для изучения его внутривидового разнообразия.

**Ключевые слова:** выборки, генетическое разнообразие, сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.).

### ВВЕДЕНИЕ

Определение структуры и объема выборки является первым важным этапом изучения изменчивости живых организмов. Как известно, для оценки внутри- и межпопуляционных различий видов выборки должны быть репрезентативными и включать неродственные индивиды (Глотов, 1983; Животовский, 1991). Отмечено, что выборка в каждой популяции должна обеспечить анализ около 50 геномов (для диплоидных видов древесных растений – около 25 особей) (Левонтин, 1978; Айала, 1984; Падутов, 2001). В молекулярно-генетических исследованиях чаще используют выборки по 10–20 (до 30) особей на ценопопуляцию (Nei, 1978; Shurkhal et al., 1992; Фундаментальные и прикладные проблемы..., 2008 и др.). Для анализа аллозимной изменчивости отбирают по 30–50 деревьев (Гончаренко и др., 1996; Санников и др., 1997; Падутов, 2001; Ларионова и др., 2004; Политов, 2007). В конечном счете объ-

ем выборки определяется ограниченными возможностями исследователя, и в выборе между «большим числом географических популяций при минимально требуемой выборке в каждой» и «меньшим числом популяций, но большей их представительностью» обычно предпочитают первое. При этом очевидна положительная зависимость числа выявляемых редких аллелей и показателей полиморфности  $P$  (доля полиморфных локусов) и  $A$  (среднее число аллелей на локус) от объема выборки. Очевидно, что аналогичная зависимость должна прослеживаться и для показателей числа гаплотипов и генотипов, которые вычисляют при оценке генетического разнообразия по ДНК-маркерам. Для уменьшения влияния объема выборки на показатели полиморфности их рассчитывают по различным критериям в анализе частот наиболее распространенных аллелей (по 95 или 99 % критериям). Однако экспериментальных работ на хвойных древесных растениях по оценке зависимости различных показате-

лей генетической изменчивости от объема и структуры выборок не проводилось.

В рекомендациях по статистическому анализу данных генетической изменчивости популяций отмечено, что величина выборки зависит от особенностей вида и изменчивости исследуемых локусов, частоты встречаемости аллелей (Шмидт, 1984; Животовский, 1991). Например, один из основных лесобразующих видов хвойных – сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – характеризуется высоким внутривидовым генетическим полиморфизмом: до 93–98 % изменчивости аллозимов сосредоточено внутри популяций и лишь 2–7 % приходится на межпопуляционные различия (Gulberg et al., 1985; Семериков и др., 1993; Prus-Glowacki, Bernard, 1994; Гончаренко и др., 1996; Экарт и др., 2014). Это, а также сведения о новых выявляемых аллелях некоторых полиморфных локусов в отдельных популяциях, произрастающих в Сибири (Тихонова, Семериков, 2010; Экарт и др., 2014), свидетельствует о необходимости уточнения величины популяционной выборки для целей выявления генетической изменчивости у такого высокополиморфного вида.

Проблема уточнения величины выборки для сосны обыкновенной и других видов хвойных актуальна в связи с планами проведения масштабного генетического мониторинга разнообразия основных лесобразующих видов древесных растений и разработкой программ по сохранению их генофондов (Глотов, 1983; Мамаев и др., 1984; Петров, 1987; Милютин, 1988; Гончаренко и др., 1996; Путенихин, 2000; Тараканов и др., 2001; Ирошников, 2002; Алтухов, 2004; Matyas et al., 2004; Allaby, 2006). В связи с оценкой внутри- и межпопуляционной изменчивости большое значение имеет также характер размещения выборок в ареале вида (Глотов и др., 1975; Санников, Петрова, 2003; Eriksson et al., 2006). Вследствие особенностей экспериментального материала этот вопрос лишь отчасти рассматривается в настоящей работе.

Цель данной работы – анализ влияния величины выборки на результаты оценок гене-

тического разнообразия «изолированных» популяций сосны обыкновенной.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли данные по аллозимной изменчивости сосны обыкновенной (Семериков и др., 1993; Тихонова, Семериков, 2010) и по изменчивости микросателлитных локусов хлоропластной ДНК (Семериков и др., 2014).

Аллозимные данные получены на основе 16 изоферментных систем, в том числе 11 полиморфных, в 9 географических популяциях сосны обыкновенной с Урала (Шарташ), Казахстана (Щучинск), Западной (Северная Сосьва, Сухой Полуй, Малая Сосьва) и Средней Сибири (Шира, Минусинск, Балгазын, Танзыбей) (табл. 1). Большая часть из них может быть отнесена к изолированным популяциям, отделенным от других популяций горами, степями или лесами из других пород. Каждая из географических популяций охарактеризована 2–8 выборками (всего 1295 деревьев в 38 выборках), которые условно можно назвать «субпопуляциями», численностью по 30–60 деревьев из различных местообитаний и/или представлявшими различные генерации (взрослые – подрост). Расстояние между субпопуляциями составляло 0.3–12 км.

Электрофоретический анализ изоферментов проводили в полиакриламидном геле в соответствии с методикой, предложенной А. В. Шурхалом с соавторами (Shurkhal et al., 1992) с небольшими модификациями. В анализе использовали следующие ферментные системы: 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD, E.C. 1.1.1.44.), шикиматдегидрогеназа (SKDH, E.C. 1.1.1.25.), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, E.C. 2.6.1.1.), алкогольдегидрогеназа (ADH, E.C. 1.1.1.1.), глутаматдегидрогеназа (GDH, E.C. 1.4.1.2.), формиатдегидрогеназа (FDH, КФ. 1.2.1.2), диафороза (DIA, E.C. 1.6.4.3), фосфоглюкомутаза (PGM, E.C. 2.7.5.1.), флюоресцентная эстераза (FEST, E.C. 3.1.1.1), супероксиддисмутаза (SOD, E.C. 1.15.1.1), сорбитолдегидрогеназа (SDH, E.C. 1.1.1.14), β-галактозидаза (B-GAL, E.C. 3.2.1.23). Гистохимичес-

**Таблица 1.** Географическое расположение популяций сосны обыкновенной, исследованных с помощью анализа хлоропластных микросателлитных локусов или аллозимного анализа

Популяция	Географические координаты		Популяция	Географические координаты	
	с. ш.	в. д.		с. ш.	в. д.
Плесецк''	63°20'	41°05'	Михайловское''	51°49'	79°47'
Апатиты''	67°36'	33°40'	Новосибирск''	55°40'	84°24'
Петербург''	59°39'	33°31'	Лесосибирск''	58°27'	92°10'
Кемь''	64°57'	34°34'	Шира*''	54°25'	89°60'
Петрозаводск''	61°47'	34°16'	Минусинск*''	53°37'	91°38'
Бирск''	55°20'	55°36'	Танзыбей*''	53°04'	92°34'
Семипалатинск''	49°00'	81°00'	Балгазын*''	51°02'	95°03'
Кустанай''	52°40'	62°10'	Шагонар''	51°31'	93°14'
Шарташ*	61°17'	63°12'	Иволгинск''	51°48'	107°16'
Щучинск*	52°58'	70°15'	Чикой''	50°17'	107°10'
М. Сосьва*	61°57'	59°36'	Н. Чикой''	51°29'	106°51'
С. Сосьва*	63°34'	61°48'	Джида''	50°31'	105°58'
С. Полуи*	63°33'	69°02'	Ульхан 1''	49°14'	112°37'
Круглое''	51°19'	80°22'	Ульхан 2''	49°14'	112°37'
Сросты''	51°59'	81°07'	Баян-Адарг''	48°33'	111°04'
Волчиха''	52°03'	80°26'	Богда-Уул''	47°49'	106°52'
Востово''	52°07'	80°36'	Хилент-Уул 1''	48°46'	111°36'
Мамонтово''	52°42'	81°38'	Биндэр''	48°39'	110°26'
Макарово''	53°17'	82°00'	Баян-Ул''	49°06'	112°58'
Крестьянка''	52°28'	81°38'	Хилент-Уул 2''	48°46'	111°36'
Барнаулское''	53°19'	83°42'	Ку''	48°45'	111°36'
Лебяжинское''	51°44'	80°52'			

Примечание. \* – географические популяции для аллозимного анализа; '' – географические популяции для анализа изменчивости хлоропластной ДНК.

кое окрашивание гелей проводили в соответствии с рекомендациями Л. И. Корочкина с соавторами (Корочкин и др., 1977). Материалом для анализа послужила хвоя.

Сравнивали основные показатели генетического разнообразия отдельных выборок (долю полиморфных локусов –  $P$ , среднее число аллелей на locus –  $A$ , эффективное число аллелей –  $n_e$ , ожидаемую –  $H_e$  и наблюдаемую –  $H_o$  гетерозиготность) с объединенными выборками, представляющими географические популяции. Генеральная совокупность составила 1295 деревьев.

Популяционную структуру и степень генетической подразделенности субпопуляций рассматривали с помощью  $F$ -статистик Райта (Wright, 1965). Соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому определяли исходя из соотношения Харди-Вайнберга с помощью точного критерия (Guo, Thompson, 1992). Общую вероятность по всем популяциям и по всем локусам  $P_i$  рассчитывали с помощью метода Фишера (Fisher, 1954) по формуле

$$P_i = -2 \sum_{i=1}^n bg(P_i), \quad (1)$$

где  $P_i$  – вероятность нулевой гипотезы, полученная для каждого локуса  $i$ . Статистика  $P_i$  распределена в соответствии с  $\chi^2$  с  $n$  степенями свободы, где  $n$  – число локусов (Sokal, Rohlf, 1994).

Генетическая дифференциация популяций оценивалась с помощью генетических дистанций Nei –  $D_N$  (Nei, 1972, 1978). Мерой значимости различий сравниваемых выборок послужили  $\chi^2$  и  $t$ -тест для качественных признаков (Животовский, 1991). Для анализа данных использовали программы BIOSYS-2 (Swofford, Salender, 1981).

Генетическое разнообразие хлоропластной ДНК изучали с помощью четырех микросателлитных локусов (cpSSR) в 38 ценопопуляциях сосны обыкновенной по всему ареалу вида (см. табл. 1), за исключением районов Якутии и Дальнего Востока. Для амплификации использованы 4 универсальные для видов сем. Pinaceae пары праймеров:

Pt30204, Pt15169, Pt71963, Pt26081 (Vendramin et al., 1996), по комбинации аллелей четырех локусов определяли гаплотип особи. Размер выборок – 14–27 деревьев, всего 839 деревьев. Оценивали несмешенное гаплотипное разнообразие  $H_e$  (Nei, 1987), нормированное на выборку размером 14–1, или ожидаемое число гаплотипов в выборке 14 особей. При оценке влияния размера выборки на гаплотипное разнообразие объединение выборок осуществлялось на географической основе двумя способами: 1) по иерархической схеме административный район → регион → вся исследованная часть ареала, 2) случайным образом – последовательным прибавлением по одной выборке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа аллозимной изменчивости в популяциях сосны приведены в табл. 2. Как видно из таблицы, исследованные популяции характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия, доля полиморфных локусов при  $P_{95}$  варьирует от 62.5 до 68.8 %, среднее число аллелей на локус ( $A$ ) – от 2.1 до 2.5, наблюдаемая ( $H_o$ ) гетерозиготность – от 0.214 до 0.248, ожидаемая ( $H_e$ ) гетерозиготность – от 0.218 до 0.262. Эффективное число аллелей ( $n_e$ ) изменяется от 1.27 до 1.33. Наибольшим числом аллелей отличается локус *Skdh-1*: 6 аллелей выявлено нами с использованием полиакриламидного геля. В литературе приводятся сведения о наличии 9 аллелей в этом локусе, выделенных с использованием крахмального геля (Ларионова, Экарт, 2010; Экарт и др., 2014).

Особого внимания заслуживает характеристика генеральной совокупности:  $P = 68.8$ ,  $A = 2.8$ ,  $H_o = 0.238$  и  $H_e = 0.247$ , всего выявлено 47 аллелей. В их числе 32 (68 %) общих для всех выборок аллелей, 15 (32 %) редких. При этом число обнаруженных аллелей изменяется от 28 до 36 в небольших и от 33 до 41 – в объединенных популяционных выборках, или 70–87 % от числа аллелей в генеральной совокупности. Частота аллелей в полиморфных локусах варьирует от 0.1 до 99 %.

Среди известных формул для расчета объема выборки мы использовали уравнение для

выявления аллельного разнообразия популяций, предложенное Л. А. Животовским (1991):

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-k)}, \quad (2)$$

где  $N$  – необходимый объем выборки,  $k$  – частота встречаемости аллеля  $a$  в генеральной совокупности,  $P$  – вероятность того, что хотя бы одна особь с данным аллелем попадет в выборку (0.95, 0.99, 0.999). Как отмечает Л. А. Животовский (1991), 50–100 особей – это реальный технически возможный объем разового камерального генетического анализа. Из расчета видно, что с вероятностью 0.95 объем выборки 60–100 деревьев может быть достаточным для обнаружения аллелей, встречающихся в популяциях с частотой не менее 3–5 %. Объем выборки 30–40 особей теоретически позволяет охватить аллели с частотой 7–10 % и выше. Однако в связи с тем, что в популяциях частота признака изменяется, при сравнении усредненных расчетных и фактических данных обнаружено превышение фактической встречаемости редких аллелей над их расчетной частотой в некоторых популяциях в 1.5–3.0 раза для  $Gdh^{0.83}$ ,  $Skdh-1^{0.98 \ 1.03}$ ,  $Adh-1^{1.12}$ ,  $Pgm-1^{0.95}$ ,  $Dia^{1.10}$ ,  $Got-1^{1.07 \ 1.03 \ 0.88}$ . В 1.2–2.0 раза реже встречаются аллели  $Dia^{0.77}$   $Adh-2^{0.59}$ . При этом превышение числа выявленных аллелей наблюдалось в тех выборках, где были образцы из разных местообитаний и генераций.

Небольшие внутривидовые выборки заметно варьируют по уровню ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности. Однако статистически достоверные отклонения от равновесного распределения генотипов обнаружены только в 18 из 38 стандартных выборок по 1–3 локусам ( $P < 0.05$ – $0.000$ ). В результате объединения число выборок с достоверными отклонениями составило 8 из 9 по 1–3 локусам.

Также уменьшилась подразделенность популяций внутри вида ( $F_{st}$ ) с 3.0 до 1.5 % ( $t = 2.36$ ;  $v = 20$ ;  $P < 0.001$ ) (табл. 3). При оценке этого показателя по объединенным данным 98.5 % генетической изменчивости сосредоточено внутри исследуемых популя-

**Таблица 2.** Основные показатели аллозимного разнообразия популяций сосны обыкновенной

Географическая популяция и суб-популяция (объем выборки)	Доля полиморфных локусов $P_{95}$ , %	Среднее число аллелей на локус $A$	Средняя гетерозиготность		Число		
			ожидаемая $H_e$	наблюдаемая $H_o$	аллелей	генотипов	локусов с отклонением от X-B*
<b>Щучинск (278)</b>	<b>62.5*</b>	<b>2.4±0.4</b>	<b>0.235±0.052</b>	<b>0.229±0.052</b>	<b>39</b>	<b>58</b>	<b>2</b>
1 (49)	62.5	2.1±0.3	0.229±0.052	0.211±0.048	33	41	0
2 (30)	62.5	2.0±0.3	0.229±0.050	0.221±0.048	32	37	1
3 (49)	62.5	2.2±0.3	0.234±0.053	0.237±0.057	35	41	1
4 (30)	62.5	2.1±0.3	0.269±0.060	0.267±0.064	33	41	0
5 (30)	62.5	2.1±0.4	0.237±0.053	0.254±0.059	33	35	0
6 (30)	62.5	2.1±0.3	0.222±0.052	0.211±0.053	34	39	2
7 (30)	62.5	2.2±0.3	0.233±0.054	0.248±0.058	35	37	0
8 (30)	62.5	2.1±0.3	0.228±0.053	0.192±0.046	33	39	1
<b>Полуй (60)</b>	<b>62.5</b>	<b>2.1±0.3</b>	<b>0.224±0.058</b>	<b>0.221±0.059</b>	<b>33</b>	<b>37</b>	<b>3</b>
1 (30)	62.5	2.1±0.3	0.231±0.059	0.236±0.063	33	35	3
2 (30)	50.0	1.8±0.2	0.194±0.060	0.190±0.059	28	27	1
<b>С. Сосьва (240)</b>	<b>62.5</b>	<b>2.3±0.3</b>	<b>0.218±0.054</b>	<b>0.214±0.054</b>	<b>37</b>	<b>50</b>	<b>2</b>
1 (30)	56.3	1.9±0.3	0.184±0.056	0.179±0.056	31	31	1
2 (30)	62.5	2.1±0.3	0.214±0.056	0.216±0.062	33	37	2
3 (30)	62.5	2.1±0.3	0.210±0.053	0.209±0.053	32	34	1
4 (30)	62.5	2.0±0.2	0.218±0.053	0.234±0.059	32	35	0
5 (30)	62.5	2.1±0.3	0.240±0.059	0.223±0.056	34	41	1
6 (30)	62.5	1.9±0.2	0.211±0.054	0.214±0.058	31	35	0
7 (30)	62.5	2.0±0.3	0.228±0.057	0.229±0.057	32	37	1
8 (30)	43.8	1.8±0.3	0.189±0.058	0.182±0.057	31	31	0
<b>М. Сосьва (113)</b>	<b>62.5</b>	<b>2.3±0.3</b>	<b>0.229±0.051</b>	<b>0.233±0.053</b>	<b>36</b>	<b>45</b>	<b>1</b>
1 (23)	62.5	2.1±0.3	0.224±0.054	0.228±0.056	33	31	0
2 (30)	62.5	2.1±0.3	0.226±0.053	0.228±0.053	33	38	0
3 (30)	62.5	2.1±0.3	0.244±0.054	0.270±0.074	34	39	1
4 (30)	62.5	1.9±0.2	0.221±0.050	0.226±0.054	31	33	0
<b>Шаргаш (120)</b>	<b>68.8</b>	<b>2.4±0.3</b>	<b>0.235±0.052</b>	<b>0.225±0.049</b>	<b>39</b>	<b>53</b>	<b>1</b>
1 (30)	62.5	2.2±0.3	0.233±0.053	0.230±0.053	34	41	0
2 (30)	62.5	2.1±0.3	0.238±0.052	0.229±0.052	33	40	0
3 (30)	68.8	2.2±0.3	0.230±0.052	0.204±0.048	35	39	2
4 (30)	68.8	2.2±0.3	0.236±0.054	0.238±0.054	35	39	0
<b>Шира (133)</b>	<b>68.8</b>	<b>2.5±0.4</b>	<b>0.239±0.053</b>	<b>0.239±0.053</b>	<b>41</b>	<b>50</b>	<b>1</b>
1 (39)	62.5	2.3±0.3	0.246±0.054	0.242±0.053	36	39	0
2 (47)	56.3	2.3±0.3	0.231±0.053	0.228±0.055	36	42	1
3 (47)	56.3	2.2±0.3	0.238±0.053	0.249±0.057	35	41	0
<b>Балгазын (120)</b>	<b>62.5</b>	<b>2.4±0.3</b>	<b>0.249±0.055</b>	<b>0.243±0.053</b>	<b>39</b>	<b>53</b>	<b>3</b>
1 (60)	62.5	2.3±0.3	0.251±0.047	0.248±0.039	34	34	1
2 (23)	62.5	2.1±0.3	0.206±0.057	0.174±0.061	35	46	1
3 (37)	62.5	2.2±0.3	0.267±0.056	0.263±0.055	37	48	0
<b>Танзыбей (76)</b>	<b>62.5</b>	<b>2.1±0.3</b>	<b>0.243±0.052</b>	<b>0.241±0.051</b>	<b>34</b>	<b>40</b>	<b>0</b>
1 (46)	68.8	2.1±0.2	0.244±0.052	0.245±0.053	34	36	1
2 (30)	62.5	1.9±0.2	0.237±0.051	0.234±0.049	31	35	0
<b>Минусинск (155)</b>	<b>62.5</b>	<b>2.3±0.3</b>	<b>0.262±0.056</b>	<b>0.248±0.054</b>	<b>37</b>	<b>50</b>	<b>2</b>
1 (50)	62.5	2.1±0.3	0.261±0.054	0.249±0.052	33	38	0
2 (30)	62.5	2.0±0.2	0.262±0.055	0.247±0.054	32	39	0
3 (43)	62.5	2.1±0.3	0.258±0.056	0.241±0.052	34	40	0
4 (32)	62.5	2.1±0.3	0.277±0.060	0.294±0.065	34	43	1
<b>Генер. (1295)</b>	<b>68.8</b>	<b>2.8±0.4</b>	<b>0.247±0.053</b>	<b>0.238±0.051</b>	<b>47</b>	<b>80</b>	<b>2</b>

Примечание. Жирным шрифтом выделены общепопуляционные выборки, \*X-B – распределение Харди-Вайнберга.

Таблица 3.  $F$ -статистики Райта

Локус	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$
	Стандартные выборки			Объединенные выборки		
<i>6-Pgd-2</i>	0.0442	0.0805	0.0380	0.0488	0.0714	0.0238
<i>Gdh</i>	-0.0585	-0.0347	0.0225	-0.0416	-0.0347	0.0066
<i>Skdh-1</i>	0.0268	0.0506	0.0245	0.0425	0.0506	0.0085
<i>Adh-1</i>	0.0119	0.00503	0.0389	0.0290	0.0503	0.0220
<i>Adh-2</i>	-0.0236	0.0036	0.0265	-0.0104	0.0036	0.0138
<i>Pgm-1</i>	0.0260	0.0602	0.0350	0.0366	0.0602	0.0245
<i>Dia</i>	-0.0147	0.0173	0.0316	-0.0021	0.0173	0.0193
<i>Got-1</i>	-0.0236	-0.0045	0.0187	-0.0133	-0.0045	0.0087
<i>Got-2</i>	0.0041	0.0354	0.0315	0.0200	0.0354	0.0158
<i>Got-3</i>	0.0183	0.0490	0.0313	0.0382	0.0492	0.0115
<i>Fe-2</i>	0.0129	0.0489	0.0365	0.0323	0.0489	0.0172
Среднее	-0.0010	0.0309	0.0299	0.0153	0.0300	0.0149

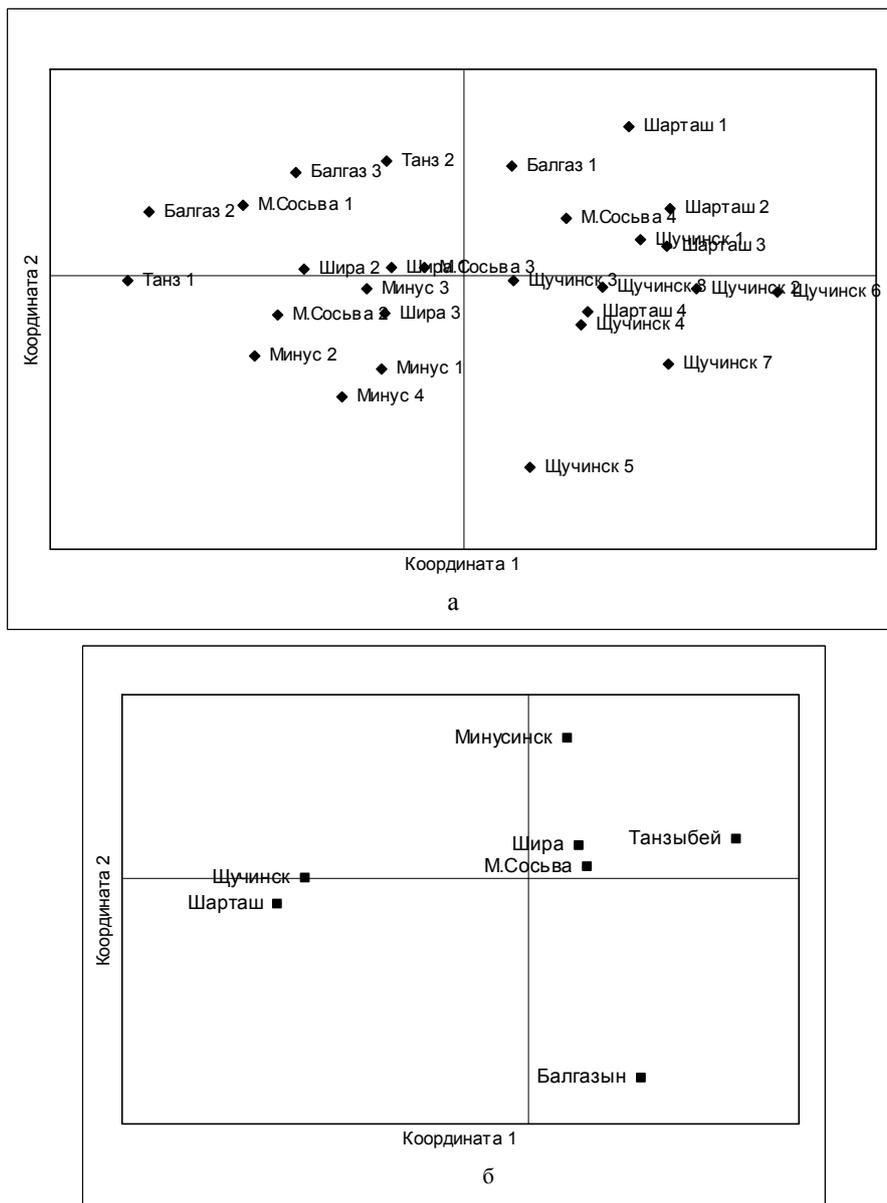
Примечание.  $F_{is}$  – инбридинг особи относительно популяции,  $F_{it}$  – инбридинг особи относительно вида,  $F_{st}$  – инбридинг популяции относительно вида. Для *6-Pgd-2* индексы вычисляли без учета двух выборок, для которых отсутствовали данные по *6-Pgd-2*, для остальных локусов и для вычисления среднего использовали все выборки.

ций. Очевидно, что снижение уровня подразделенности при объединении субпопуляций имеет статистическую природу и вызывается уменьшением дисперсии выборочных оценок частот аллелей при увеличении объема выборок. В заключение обсуждения данных табл. 3 отметим, что наибольший вклад в дифференциацию популяций по аллозимным маркерам вносят локусы *6-Pgd-2*, *Adh-1* и *Pgm-1*, по ним различия между популяциями достигают 2.2–2.5 %. По отдельным локусам значения  $F_{st}$  варьируют от 0.7 до 2.5 %.

Аналогичный результат по оценке влияния объединения выборок на уровень межпопуляционных различий получен и в отношении генетических дистанций  $Nei$  ( $Nei$ , 1972, 1978). При оценке различий между выборками внутри популяций их значения составили 0.004–0.013 (по  $Nei$ , 1972) и 0.001–0.008 (по  $Nei$ , 1978). При попарном сравнении всех небольших выборок между собой эти величины варьировали в пределах 0.003–0.026 и 0.001–0.021 соответственно (приведены дистанции только между выборками разных популяций). После объединения выборок дистанции  $Nei$  между популяциями сократились до 0.003–0.007 и 0.002–0.006 соответственно. Однако характер дифференциации «изолированных» популяций на плоскости главных координат остался прежним (рис. 1).

Как отмечено (Семериков и др., 2014), ранее в результате изучения генетического разнообразия четырех хлоропластных микросателлитных локусов (срSSR) в 38 ценопопуляциях сосны обыкновенной выделено 27 аллелей. Общее число выявленных гаплотипов составило 164. Установлено довольно высокое гаплотипное разнообразие ( $H_e$ ) во всех популяциях – от 0.924 до 0.989, доля внутривидовой изменчивости составляет 97.9 %, межпопуляционной ( $R_{st}$ ) – 2.1 %. Средний для популяций индекс  $D_{sh}^2$  изменяется в пределах 2.5–6.0. В целом из общего числа довольно часто (10 раз и более) встречаются 26 гаплотипов, реже (от 2 до 10 раз) – 77 гаплотипов, уникальных (встречаются только 1 раз) было 61. В каждой из популяций обнаружено по 13–21 общему гаплотипу.

Для регрессионного анализа зависимости числа обнаруженных гаплотипов маркеров хлоропластной ДНК от объема выборки популяционные выборки последовательно объединяли по иерархической схеме. Их число возрастало от административных районов (2–10 выборок) к регионам (6–20 выборок), к российской (29 выборок) и ко всей исследуемой части ареала (38 выборок). Как показывает регрессионный анализ, абсолютное число выявленных хлоропластных гаплотипов во многом зависит от числа выборок на исследуемых территориях (рис. 2) – зависимость логарифмическая, с высоким коэффи-



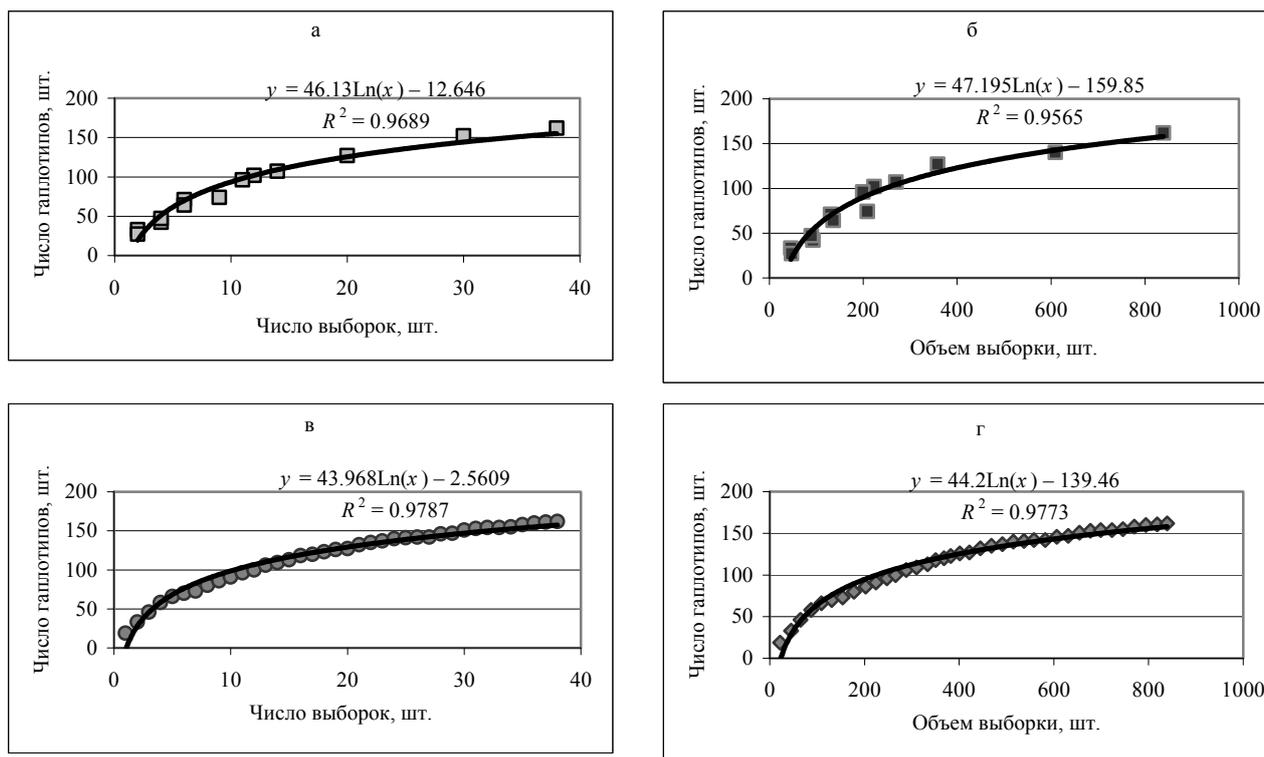
**Рис. 1.** Распределение 28 субпопуляционных (а) и 7 популяционных (б) выборок сосны обыкновенной на плоскости главных координат, рассчитанных с помощью PCA-анализа дистанций Nei (Nei, 1978).

циентом детерминации  $R^2 = 0.97$ . Не менее тесная ( $R^2 = 0.96$ ) зависимость наблюдается также между числом гаплотипов и объемами тех же объединенных выборок.

При случайном последовательном способе объединения выборок обнаружены аналогичные зависимости (см. рис. 2, в, г). Процедура включала поэтапное объединение первых двух по списку выборок и подсчет числа гаплотипов, затем к ним присоединялась третья выборка и подсчитывалось число гаплотипов и т. д.

Для исследования высокоизменчивых хлоропластных маркеров, согласно полученному уравнению регрессии, анализ образцов

с 300 деревьев позволяет учесть более 100 гаплотипов. Например, объединение двух популяционных выборок из Тувы и четырех из Красноярского края и Хакасии привело к увеличению числа гаплотипов с 33 и 47 до 64 соответственно. В результате число выявленных гаплотипов для более крупных фрагментов ареала вида увеличилось до 26 % в Туве, 35 % – в Красноярском крае и Хакасии (47 % – в Средней Сибири при объединении выборок из Тувы, Хакасии и Красноярского края), 73 % – в Западной Сибири (12 выборок) и 53 % – на северо-западе европейской части ареала (6 выборок) от общего числа. В целом в российской части



**Рис. 2.** Зависимость числа выявленных хлоропластных гаплогипов (cpSSR) от числа (а, в) и объема (б, г) выборок, анализируемая по иерархической схеме (а, б) и последовательным прибавлением выборок (в, г).

ареала обнаружено 152 гаплогипа (93 % от общего числа), в монгольской – 74 (45 %) в 9 выборках.

Для устранения эффекта объема выборок использовали не абсолютные величины, а стандартизированные на определенный размер минимальной выборки, в нашем случае (Лебяжинское, Алтай) 14 минус один ( $r_{14} - 1$ ). Это соответствует ожидаемому числу гаплогипов в выборке объемом 14 особей. Из данного числа вычитается единица, поскольку при отсутствии изменчивости выявляется один гаплогип. Эта величина варьировала в более узких пределах – от 8.1 до 12.0, в большинстве случаев от 9.0 до 10.9, т. е. число гаплогипов в популяционных выборках составляет 62–93 % от максимально возможного в случае ( $14 - 1 = 13$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена существенная взаимосвязь между объемом исследуемых популяционных выборок и показателями их генетического разнообразия – изменчивости аллозимов и хлоропластных микросателлитных локусов (cpSSR) ДНК. Как показывают результаты

проведенного исследования, увеличение объема выборки с 30–40 до 100 деревьев и выше приводит к существенному росту оценок аллельного и генотипического разнообразия популяций. Внутри популяций обнаруживается до 70–87 % числа выявленных аллелей и до 62–93 % числа хлоропластных гаплогипов вида. Доля индивидуальной изменчивости внутри популяций ( $F_{st}$ ) составляет 98.5 % по данным аллозимного анализа и 97.9 % – по cpSSR, т. е. использование разных генетических маркеров дает близкие оценки доли популяционного разнообразия вида.

Необходимо отметить, что увеличение числа выявленных аллелей и уменьшение генетических дистанций  $Nei$  ( $Nei$ , 1972, 1978) не сопровождается изменением характера дифференциации популяций. Это свидетельствует о том, что стандартные объемы выборок позволяют адекватно оценить популяционную генетическую структуру вида.

Таким образом, с учетом имеющихся сведений о гено- и биогеографии этого вида следует признать, что для дальнейших исследований популяционной структуры сосны обыкновенной имеющиеся размеры выборок, принятые для анализа кодоминантных ядер-

ных маркеров и маркеров хлоропластной ДНК, являются приемлемыми. Для исследований внутривидового генетического разнообразия требуется принятие размера выборок, адекватного цели конкретного проекта и, как правило, существенно превышающего установленные «стандартные» 30–50 особей.

Существует еще одна проблема в исследовании популяционной структуры сосны обыкновенной и хвойных видов в целом – это произвольный отбор «популяций» для генетического анализа, вне связи с ландшафтно-географическими особенностями ареалов видов. Важность последнего отмечали Л. Ф. Семериков и Н. В. Глотов (1983), Л. Ф. Семериков (1986), Л. А. Животовский (1991), С. Н. Санников и И. В. Петрова (2003), А. И. Видякин (2007) и др. В настоящее время решение этого вопроса (установления популяционной географии вида) для активно исследуемых видов хвойных представляется одним из наиболее актуальных.

Установление популяционно-географической структуры вида и детальный анализ внутривидовой генетической изменчивости ДНК в нескольких модельных популяциях на выборках 300–500 деревьев помогли бы пролить свет на вопрос, насколько разнообразие выявленных в популяциях гаплотипов зависит от числа выборок (следовательно, от площади части ареала) и в какой степени – от их объема. Это трудоемкое и затратное отдельное исследование важно не только с методической точки зрения (в генетических исследованиях, в выборе стратегии сохранения генофондов видов), но и для лучшего понимания механизмов генетической адаптации видов к различным условиям произрастания.

*Авторы выражают благодарность В. В. Тараканову, С. Жамьянсурену, Н. А. Тихоновой, Л. И. Кальченко, А. К. Экарт и А. П. Барченкову за помощь в сборе образцов и обсуждении результатов.*

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-04-00495-а и 14-04-10028-к.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айала Ф.* Введение в популяционную и эволюционную генетику. М.: Мир, 1984. 230 с.
- Алтухов Ю. П.* Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 40–59.
- Видякин А. И.* Фенетика, популяционная структура и сохранение генетического фонда сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Хвойные бореальной зоны. 2007. Вып. 24. № 2–3. С. 159–166.
- Глотов Н. В.* Оценка генетической гетерогенности природных популяций: количественные признаки // Экология. 1983. № 1. С. 3–10.
- Глотов Н. В., Семериков Л. Ф., Верещагин А. В.* Естественноисторическое исследование скального дуба (*Quercus petraea* Liebl.) на Северо-Западном Кавказе // Журн. общ. биол. 1975. Т. 36. № 4. С. 537–554.
- Гончаренко Г. Г., Дробышевская В. В., Силин А. Е. и др.* Генетические ресурсы сосен России и сопредельных государств // Докл. РАН. 1996. Т. 346. № 3. С. 419–423.
- Животовский Л. А.* Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
- Ирошников А. И.* О концепции и программе генетического мониторинга популяций лесных древесных растений // Лесоведение. 2002. № 1. С. 58–64.
- Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И.* Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 275 с.
- Ларионова А. Я., Экарт А. К.* Генетическое разнообразие и дифференциация болотных популяций сосны // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. XXVII. № 1–2. С. 120–126.
- Ларионова А. Я., Яхнева Н. В., Абаимов А. П.* Генетическое разнообразие и дифференциация популяций лиственницы Гмелина в Эвенкии (Средняя Сибирь) // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1370–1377.
- Левонтин Р.* Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. 352 с.
- Мамаев С. А., Махнев А. К., Семериков Л. Ф.* Принципы выявления и сохранения генетических ресурсов древесных растений в

- лесах СССР // Лесн. хоз-во. 1984. № 11. С. 35–38.
- Милютин Л. И.* Лесные генетические ресурсы Сибири // Современное состояние исследования естественной дендрофлоры с особым учетом сохранения ее генофонда: X конгр. дендрологов. София, 1988. С. 272–277.
- Падутов В. Е.* Генетические ресурсы сосны и ели Беларуси. Гомель: ИЛ НАНБ, 2001. 144 с.
- Петров С. А.* Генетические ресурсы лесобразующих видов, пути их сохранения и рационального использования // Лесоразвед. и лесомелиор. 1987. Вып. 1. С. 1–32.
- Политов Д. В.* Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. Pinaceae) Северной Евразии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: ИОГен РАН, 2007. 47 с.
- Путенихин В. П.* Популяционная структура и сохранение генофонда хвойных видов на Урале: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Красноярск: ИЛ СО РАН, 2000. 48 с.
- Санников С. Н., Семериков В. Л., Петрова И. В. и др.* Генетическая дифференциация разновысотных популяций сосны обыкновенной на Урале и в Карпатах // Экология. 1997. № 3. С. 139–142.
- Санников С. Н., Петрова И. В.* Дифференциация популяций сосны обыкновенной. Екатеринбург: УрО РАН, 2003. 246 с.
- Семериков В. Л., Подогаз А. В., Шурхал А. В.* Структура изменчивости аллозимных локусов в популяциях сосны обыкновенной // Экология. 1993. № 1. С. 18–25.
- Семериков В. Л., Семерикова С. А., Дымшакова 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.
- Семериков Л. Ф.* Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.
- Семериков Л. Ф., Глотов Н. В.* Популяционная структура дуба черешчатого // Физиологическая и популяционная изменчивость (популяционная изменчивость): Сб. науч. тр. Саратов: Изд-во Саратов. гос. ун-та, 1983. С. 81–83.
- Тараканов В. В., Демиденко В. П., Ишутин Я. Н. и др.* Селекционное семеноводство сосны обыкновенной в Сибири. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 2001. 230 с.
- Тихонова И. В., Семериков В. Л.* Генетический полиморфизм карликовых сосен на юге Средней Сибири // Экология. 2010. № 5. С. 330–335.
- Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Ч. 3. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2008. С. 60–132.
- Шмидт В. М.* Статистические методы в ботанике. М.: Наука, 1984. 288 с.
- Экарт А. К., Ларионова А. Я., Зацепина К. Г. и др.* Генетическое разнообразие и дифференциация сосны обыкновенной в Южной Сибири и Монголии // Сиб. экол. журн. 2014. № 1. С. 69–78.
- Allaby M.* Temperate forest (Biomes of the Earth). N.-Y.: Chelsea House, 2006. 261 p.
- Eriksson G., Ekberg I., Clapham D.* An introduction to forest genetics. Uppsala, 2006. 185 p.
- Fisher R. A.* Statistical methods for research workers. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1954. 356 p.
- Gulberg U., Yazdani R., Rudin D. et al.* Allozyme variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Sweden // Silv. Genet. 1985. V. 34. N. 6. P. 193–200.
- Guo S. W., Thompson E. A.* Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles // Biometrics. 1992. V. 48. P. 361–372.
- Matyas C., Ackzell L., Samuel C. J. A.* EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use for Scots pine (*Pinus sylvestris*) // Plant Genet. Res. Inst. Rome: IPGRI, 2004. 6 p.
- Nei M.* Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.
- Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. V. 89. P. 583–590.
- Nei M.* Molecular Evolutionary Genetics. N.-Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
- Prus-Glowacki W., Bernard B. R.* Genetic variation of *Pinus sylvestris* L. from Spain in rela-

- tion to other European populations // *Silv. Genet.* 1994. V. 43. N. 1. P. 7–14.
- Shurkhal A. V., Podogas A. V., Zhivotovsky L. A.* Allozyme differentiation in the genus *Pinus* // *Silv. Genet.* 1992. V. 41. P. 105–109.
- Sokal R. R., Rohlf F. J.* *Biometry: The principles and Practice of Statistics in Biological Research.* N.-Y.: Freeman, 1994. 887 p.
- Swofford D. L., Salender R. B.* BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // *Heredity.* 1981. V. 72. P. 281–283.
- 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. N. 5. P. 595–598.
- Wright S.* The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // *Evolution.* 1965. V. 9. P. 395–420.

### About Samples in the Research of Intraspecific Genetic Diversity of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.)

I. V. Tikhonova<sup>1</sup>, V. L. Semerikov<sup>2</sup>, S. A. Semerikova<sup>2</sup>,  
O. V. Dymshakova<sup>2</sup>, K. G. Zatssepina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch  
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Plant and Animal Ecology, Russian Academy of Sciences, Ural Branch  
8 Marta str., 202/3, Yekaterinburg, 620144 Russian Federation

E-mail: selection@ksc.krasn.ru, semerikov@ipae.uran.ru, s.a.semerikova@ipae.uran.ru,  
dymshakova@rambler.ru, kseniya-zacepina@yandex.ru

The influence of sample size on the results of the assessments of the genetic diversity of populations of Scots pine on the variability of 12 polymorphic loci isoenzymes and 4 chloroplast microsatellite loci (cpSSR). It was shown that increasing the sample size (to over 100 trees in the population) leads to significant increase in estimates of allozyme diversity (number of alleles and genotypes) and haplotype diversity of chloroplast DNA (microsatellite loci cpSSR) and to the reduction of inter-population genetic distance *Nei* without significantly changing the parameters characterizing the genetic structure of the species. Standard sample sizes allow reliable estimation of the population genetic structure of the species, but is not sufficient to study its intra-population diversity.

**Keywords:** *the sample, genetic polymorphism, Scots pine (Pinus sylvestris L.).*