

Генетический полиморфизм сосны сибирской кедровой (*Pinus sibirica* Du Tour) в Кузнецком Алатау

Н. В. ОРЕШКОВА^{1, 2, 3}, Т. С. СЕДЕЛЬНИКОВА³, С. П. ЕФРЕМОВ³, А. В. ПИМЕНОВ^{2, 3}

¹ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28
E-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru

²Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

³Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

Статья поступила 24.12.2019

После доработки 04.03.2020

Принята к печати 04.03.2020

АННОТАЦИЯ

Исследован полиморфизм ДНК семи ценопопуляций сосны сибирской кедровой (*Pinus sibirica* Du Tour), произрастающих в характерном для горно-таежных кедровников регионе — северо-восточной части Кузнецкого Алатау. По 11 ядерным микросателлитным локусам выявлено 44 аллельных варианта, существенно отличающихся у изученных ценопопуляций по составу и частотам встречаемости. Самый высокий уровень аллельного разнообразия имеют локусы *Ps_80612*, *Ps_1502048*, в которых выявлено 8 и 7 аллелей соответственно. Расчет основных параметров генетического разнообразия показал в целом сравнительно невысокий уровень полиморфизма исследованных выборок ($N_A = 3,078$; $N_E = 1,877$; $H_E = 0,445$; $H_O = 0,401$). Анализ степени подразделенности ценопопуляций выявил, что внутри популяций сосредоточено около 95 % всего генетического разнообразия, тогда как на межпопуляционную составляющую приходится всего около 5 % ($F_{ST} = 0,049$). Диагностированные различия в уровне генетического полиморфизма *P. sibirica* определяются: наличием между ценопопуляциями орографических и фитоценологических барьеров, обуславливающих направления векторов распространения семян вдоль водотоков бассейнов рек, формирующих р. Чулым в восточном секторе Кузнецкого Алатау и р. Томь — в западном; значительным уровнем биоклиматической и экологической экстремальности местопроизрастаний ценопопуляций в соответствии с высотой над уровнем моря; антропогенной нагрузкой, включающей периодические рубки и рекреационное воздействие на расположенные вблизи населенных пунктов ценопопуляции. Данные факторы, имеющие выраженную микроэволюционную составляющую, детерминируют адаптивные тренды ценопопуляций *P. sibirica*, морфологическое своеобразие и репродуктивный потенциал деревьев и, в конечном счете, контролируют их генетический полиморфизм в исследованной части Кузнецкого Алатау.

Ключевые слова: *Pinus sibirica*, микросателлиты, генетическое разнообразие, гетерозиготность, Кузнецкий Алатау.

Одним из ключевых инструментов для получения информации о генетических процессах в популяциях древесных растений являются молекулярно-генетические маркеры [Бушбом и др., 2012; Ando et al., 2014; Xiong et al., 2016]. Наибольшее значение их использование приобрело в исследованиях межвидового и внутривидового генетического полиморфизма различных видов хвойных, обладающих длительным периодом онтогенеза, что значительно затрудняет применение традиционных генетических методов [Wachowiak et al., 2006; Vandeligt et al., 2011; Мельникова и др., 2012; Liu et al., 2012].

Сосна сибирская кедровая, или кедр сибирский (*Pinus sibirica* Du Tour), является одним из основных лесообразующих видов бореальных лесов Северного полушария. Вопросы дифференциации популяций данного вида в различных экологических условиях произрастания посвящено несколько публикаций. Несмотря на проведенные для различных регионов Сибири обширные исследования аллозимной изменчивости в популяциях, определяемой их географическим положением [Крутовский и др., 1989; Политов и др., 1992; Петрова и др., 2010], работы по выявлению роли экологических барьеров в формировании генетической структуры и дифференциации кедров сибирского в разных местопроизрастаниях выполнены на единичных объектах [Орешкова и др., 2014].

Очевидно, что полученные к настоящему времени данные по сравнительному анализу морфофизиологических признаков репродуктивной сферы, цитогенетических параметров, а также полиморфизма белок-кодирующих последовательностей (изоферментов) популяций кедров сибирского из разных экотопов немногочисленны и достоверно диагностируют лишь их экотопическую дивергенцию, оставляя открытым вопрос о возможной генетической дифференциации на уровне непосредственного носителя наследственной информации — ДНК [Мудрик и др., 2012; Орешкова и др., 2014].

Ранее были проведены исследования генетического полиморфизма в различных популяциях *P. sibirica* с использованием ДНК-маркеров, разработанных для близкородственного вида — сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.) [Мудрик и др., 2012]. Исследований генетического полиморфизма

в популяциях кедров сибирского с использованием молекулярно-генетических маркеров, разработанных специально для данного вида, ранее не производилось [Белоконь и др., 2016]. Это обуславливает актуальность проведенного нами исследования, поскольку в представленной работе приводятся качественно новые данные по оценке генетической изменчивости, структуре и дифференциации популяций *P. sibirica*, основанные на исследовании полиморфизма ДНК с использованием видоспецифичных маркеров ядерного генома (SSR-маркеры), разработанных именно для кедров сибирского.

Ядерные микросателлиты (SSR — simple sequence repeat) представляют собой простые короткие tandemные повторы, длина повторяющейся единицы которых составляет менее 10 (обычно 2–6) пар оснований [Хемлебен и др., 2003]. Достоинством микросателлитного анализа является большое число локусов (независимых маркеров) и аллелей, высокий уровень полиморфизма, кодоминантность, что позволяет легко идентифицировать гомозиготные и гетерозиготные генотипы. Все эти качества SSR-маркеров делают их высокоинформативными и удобными для изучения генетической структуры и дифференциации исследуемых популяций.

Целью настоящей работы является определение уровня генетического разнообразия, структуры и степени внутривидовой дифференциации ценопопуляций сосны сибирской кедровой, произрастающих в экологически различающихся условиях характерного для горно-таежных кедровников региона — Кузнецкого Алатау.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования послужили семь ценопопуляций кедров сибирского, расположенных в северо-восточной части Кузнецкого Алатау (рис. 1). Географическая локализация, орографическая приуроченность и лесоводственная характеристика ценопопуляций представлены в табл. 1. Объем анализируемой выборки в каждой из семи ценопопуляций составил 30 деревьев.

Из ранее разработанных в лаборатории лесной геномики СФУ ядерных микросателлитных локусов для кедров сибирского были

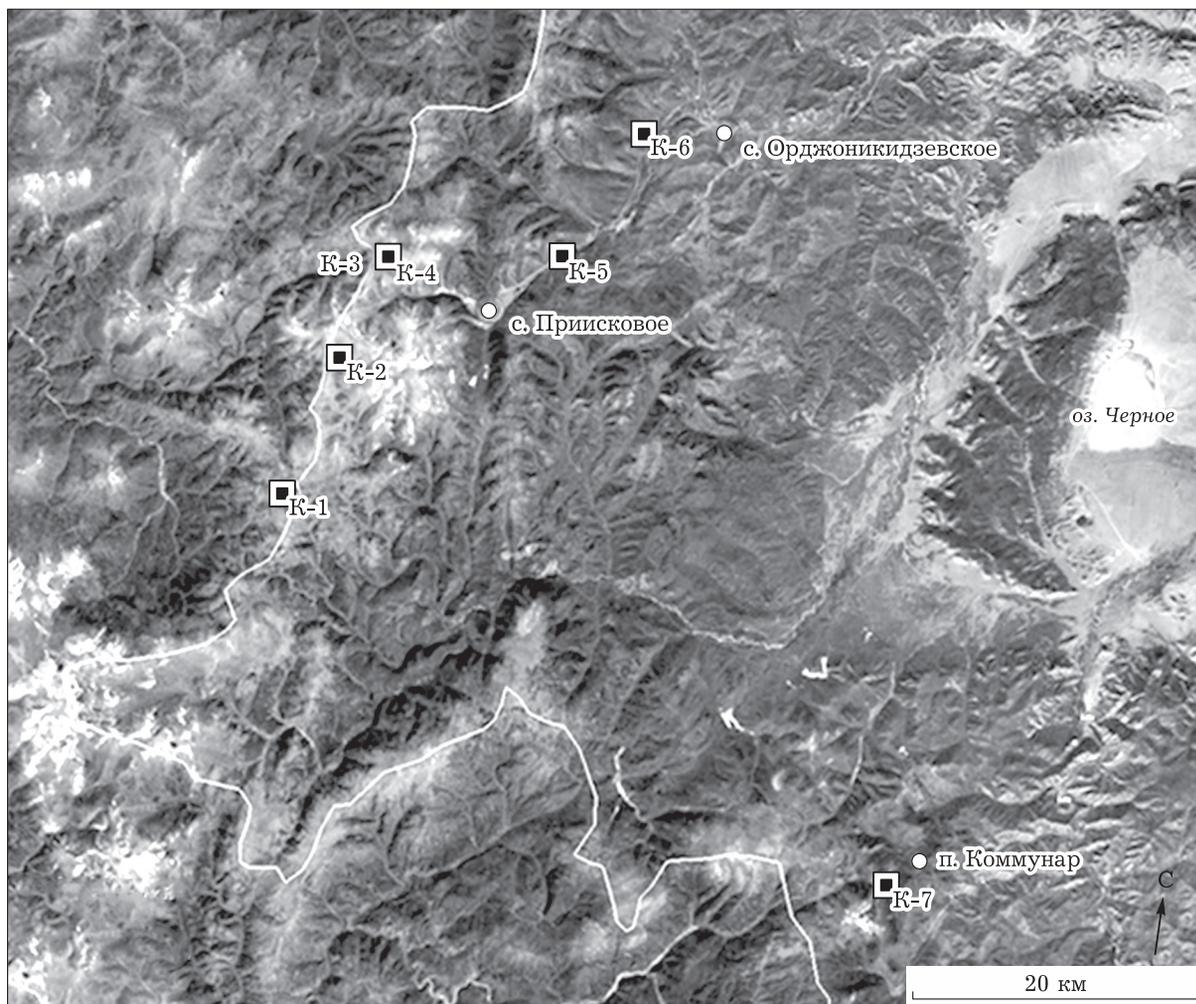


Рис. 1. Картографическое расположение ценопопуляций *P. sibirica* (К-1 – К-7) на территории Кузнецкого Алатау

отобраны 11 пар праймеров (табл. 2), демонстрирующих наиболее стабильно интерпретируемые спектры [Белоконь и др., 2016]. Биологическим материалом послужили 210 образцов хвои *P. sibirica* (7 ценопопуляций × 30 деревьев), собранные в августе 2014 г.

Препараты тотальной ДНК были выделены модифицированным методом с применением цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ) из образцов тканей высушенной хвои [Devey et al., 1996]. Для проведения ПЦР использовали готовые реакционные смеси для амплификации ДНК “GenePakPCRCore” производства ООО “Лаборатория Изоген”, содержащие ингибированную для “горячего старта” Taq-ДНК-полимеразу, дизоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-м полиакриламидном геле с использованием трис-

EDTA-боратного электродного буфера в камерах для вертикального фореза. Окраску геля проводили в растворе бромистого этидия с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды рBR 322 *E. coli*, обработанную рестриктазой *HpaII*. Основные показатели генетического разнообразия рассчитывали 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 модулях Neighbor и Consense пакета программ PHYLIP [Felsenstein, 1989] и в программе STATISTICA [StatSoftI. STATISTICA, 2007].

**Биоэкологическая характеристика ценопопуляций *P. sibirica* в северо-восточной части нагорья
Кузнецкий Алатау**

Код ценопопу- ляционной выборки	Географические координаты, высота над уровнем моря	Орографические и фитоценоотические условия; морфологические особенности деревьев	Таксационные показатели насаждений		
			высота, м	диаметр, см	возраст, лет
К-1	54°37' с. ш. 88°35' в. д. 1350 м	Северо-восточный подветренный склон горы Булка. Кедровое мшисто-травяно-кустарниковое мелкодревесное редколесье. <i>P. sibirica</i> представлена большим разнообразием формирующихся в подгольцовом поясе морфологических типов деревьев с юбочной, флагообразной, шарообразной, куполообразной, раскидистой, колоннообразной, многовершинной и другими формами крон	1,5–2,8	5–12	65–110
К-2	54°36' с. ш. 88°36' в. д. 1290 м	Юго-западный наветренный склон горы Булка. Условно разновозрастный кедровник зеленомошно-гипново-черничный. <i>P. sibirica</i> представлена крупными, “кряжистыми” деревьями с сильно сбежистыми стволами и развитыми многосуковатыми, низко нависающими над поверхностью почвы кронами куполообразной, зонтиковидной или уплощенной форм	7–11	32–53	190–280
К-3	54°40' с. ш. 88°38' в. д. 1370 м	Юго-западный пологий склон горы Арарат. Кедровое группово-куртинное мшисто-травяно-кустарниковое мелкодревесное редколесье. <i>P. sibirica</i> представлена взрослыми деревьями с юбочной, куполообразной, флагообразной, шарообразной и другими формами крон в их одиночном, групповом и куртинном вариантах произрастания	2–3,5	12–18	100–130
К-4	54°40' с. ш. 88°38' в. д. 1370 м	Юго-западный пологий склон горы Арарат. Кедровое группово-куртинное мшисто-травяно-кустарниковое мелкодревесное редколесье. <i>P. sibirica</i> представлена гнездовыми группами ювенильного подроста в количестве 150–200 групп/га.	0,3–0,4	1–3	10–20
К-5	54°41' с.ш. 88°49' в. д. 780 м	Плоская площадка каменистого крутосклона южной экспозиции на левобережье р. Сарала. Кедровник зеленомошно-низкотравный с караганой. <i>P. sibirica</i> представлена относительно невысокими деревьями с сильно сбежистыми стволами, шарообразными, раскидистыми, овальными, обратнойцевидными и другими формами крон	12–15	40–65	110–130
К-6	54°46' с. ш. 88°53' в. д. 650 м	Пологая ступень горной гряды, протянувшейся вдоль левого берега р. Сарала. Кедровник травяно-зеленомошный, локально разделенный высокотравными лугами на перелески с группово-куртинным пространственным распределением деревьев основной породы и сопутствующих темнохвойных видов. <i>P. sibirica</i> представлена деревьями с раскидистыми, шатровыми формами густых крон, крупными скелетными ветвями	27–33	45–60	180–250
К-7	54°20' с. ш. 89°16' в. д. 830 м	Южные склоны горной гряды, примыкающей к пос. Коммунар. Кедровник кустарниково-разнотравный. <i>P. sibirica</i> представлена крупносуковатыми деревьями с колоннообразной и раскидистой формами крон, начинающимися в 1–2 м от поверхности почвы	18–22	48–52	210–240

Праймеры для 11 микросателлитных локусов *P. sibirica*, используемые в работе

Локус	Мотив	Последовательность праймеров	Длина фрагмента
<i>Ps</i> _1502048	(AAT) ₁₁	F: AGATCCATCCCAATCACAGTTC R: AGGGACCTAGCACTTTCATCCT	177–201
<i>Ps</i> _80612	(AAG) ₁₀	F: CTTCTAAGTGGGTCACTTTGGC R: CTGTCTAGGCTTTTGGCCTTTA	162–180
<i>Ps</i> _39709	(ATGT) ₅	F: GTTCTCTTAAACCTCGAACTTGTGAT R: CTGAAAACCTGTCAAACAACA	202–226
<i>Ps</i> _25463	(GGT) ₇	F: ACTACTCCCGAAGGCGTAAAC R: TTTTGAGATGTGT GGAGAGGAC	107–116
<i>Ps</i> _31489	(AGA) ₆	F: CACCCAAACAAGACAAACCTCT R: TTCTCTCCTTCCCCTTATTC	182–188
<i>Ps</i> _1179752	(TGC) ₁₀	F: GCTGCTGAAAGACACTGCTACT R: CAGAGAAAAGGAAGCAACAACAG	191–206
<i>Ps</i> _1375177	(CAT) ₁₀	F: ATGGGCTAGATGGTAGCAGTTC R: GGTGGTTTTGGCTCTCTAAATG	206–239
<i>Ps</i> _718958	(TAT) ₁₀	F: CТATGTATGGGTCAATGGTGTCC R: GATGCAACAAATGCACATGACT	198–210
<i>Ps</i> _30675	(ATG) ₆	F: GGCTCATAGTGCTGATAAAGGC R: GACTGGTCTCATGGCTGCTAAC	194–200
<i>Ps</i> _25981	(TATT) ₅	F: TTGAGTGGGATGGACATAGAG R: TTGCCCAAGTCTACAAGAT	170–178
<i>Ps</i> _364418	(TGA) ₁₀	F: TCGGACSTAAAGAAAAGAGGTG R: AAGATTCGTCTGAGTGGACGTT	162–177

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе исследования 11 ядерных микросателлитных локусов в семи выборках кедров сибирского из ценопопуляций Кузнецкого Алатау выявлено 44 аллельных вариантов. Установлено, что идентифицированные микросателлитные локусы существенно отличаются у изученных ценопопуляций по составу и частотам встречаемости выявленных аллелей. Наибольшее количество аллелей выявлено у выборки К-5 – 39 (из них 12 редких, частота встречаемости которых менее 5 %). Наименьшее число аллельных вариантов у выборки К-6 – 31 (из них 6 являются редкими). Все 11 локусов были полиморфными, за исключением одного варианта — локус *Ps*_1179752 в ценопопуляции К-6 оказался мономорфным.

При помощи программы MICRO-CHECKER [van Oosterhout et al., 2004] были выявлены скрытые *null*-аллели в локусах *Ps*_80612 (в выборках К-3 и К-5), *Ps*_39709 (в выборках К-1, К-2 и К-3), *Ps*_718958 (в выборках К-2 и К-5). Частоты скрытых *null*-аллелей расчи-

тывали исходя из предположения о том, что популяции находятся в равновесном состоянии, согласно правилу Харди – Вайндберга [Chakraborty, 1992].

Самый высокий уровень аллельного разнообразия в исследованных выборках кедров сибирского имеют локусы *Ps*_80612, *Ps*_1502048, в которых выявлено 8 и 7 аллелей соответственно.

Для определения уровня генетического разнообразия в каждой из семи выборок кедров сибирского рассчитывали основные показатели генетической изменчивости на основании аллельных частот 11 локусов (табл. 3).

Расчет основных параметров генетической изменчивости показал, что включенные в исследование выборки *P. sibirica* различны по уровню генетического разнообразия. Анализ данных выявил, что наиболее высокие значения почти всех параметров генетической изменчивости обнаружены в выборках К-5 ($N_A = 3,545$; $N_E = 1,987$; $H_E = 0,431$; $H_O = 0,494$) и К-3 ($N_A = 3,364$; $N_E = 2,105$; $H_E = 0,432$; $H_O = 0,479$) (см. табл. 3). Самые

Основные показатели генетической изменчивости *P. sibirica*, рассчитанные по результатам ядерного микросателлитного анализа

Код ценопопуляционной выборки	N_A	N_E	H_O	H_E	F
К-1	2,909	1,951	0,421	0,411	-0,053
К-2	3,000	1,910	0,473	0,420	-0,086
К-3	3,364	2,105	0,479	0,432	-0,098
К-4	3,000	1,797	0,436	0,397	-0,067
К-5	3,545	1,987	0,494	0,431	-0,119
К-6	2,818	1,753	0,415	0,370	-0,062
К-7	2,909	1,640	0,397	0,349	-0,104
В среднем для всех исследованных ценопопуляций	$3,078 \pm 0,134$	$1,877 \pm 0,077$	$0,445 \pm 0,029$	$0,401 \pm 0,023$	$-0,084 \pm 0,026$

Примечание. 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.

низкие показатели изменчивости были в выборке К-7 ($N_A = 2,909$; $N_E = 1,640$; $H_E = 0,349$; $H_O = 0,397$). В целом значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о сравнительно невысоком уровне разнообразия при сопоставлении с аналогичными показателями, приведенными для кедровых сосен другими авторами [Salzer et al., 2009; Мудрик и др., 2012].

В изученных нами выборках из Кузнецкого Алатау отмечен избыток гетерозиготных генотипов. Самый высокий коэффициент инбридинга оказался в выборках К-5 ($F = -0,119$) и К-7 ($F = -0,104$). Согласно литературным данным, избыток гетерозигот в целом является характерным для горных популяций кедра сибирского [Петрова и др., 2010, 2014].

С помощью F -статистик Райта [Guries, Ledig, 1982] была предпринята попытка определить структуру и степень генетической подразделенности включенных в исследование природных ценопопуляций кедра сибирского из Кузнецкого Алатау. Для каждого из 11 полиморфных локусов вычисляли коэффициенты инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}), инбридинга особи относительно вида (F_{IT}) и инбридинга популяции относительно вида в целом (F_{ST}).

Анализ популяционной структуры *P. sibirica* (табл. 4) показал, что в изученных выборках наблюдается 10%-й дефицит гомози-

готных генотипов относительно популяции ($F_{IS} = -0,100$) и почти 5%-й ($F_{IT} = -0,046$) относительно вида.

Полокусные значения показывают, что наиболее значимый дефицит гомозигот наблюдается в локусах $Ps_1375177$ и Ps_30675 . Коэффициент инбридинга популяции относительно вида в целом (F_{ST}), отражающий степень подразделенности популяций, варьирует от 0,011 (Ps_25643) до 0,142 (Ps_718958), составляя в среднем 0,049. Это свидетельствует о том, что только около 5 % выявленной генетической изменчивости у изученных выборок кедра сибирского распределяется между популяциями. Внутри популяций сосредоточено около 95 % всего генетического разнообразия. Наибольший вклад в дифференциацию изученных популяций вносят локусы Ps_718958 и $Ps_1179752$ (см. табл. 4). Следует, однако, отметить, что установленное нами значение показателя F_{ST} отражает главным образом различия между выборками кедра сибирского с восточного сектора Кузнецкого Алатау (бассейн р. Чулым) и одиночной выборки К-2 с западного сектора Кузнецкого Алатау (бассейн р. Томь). При включении в расчеты только выборок с восточного сектора значение F_{ST} уменьшается и составляет 0,039.

Анализ гетерогенности аллельных частот с помощью критерия χ^2 показал, что у трех (Ps_39709 , Ps_31489 , $Ps_1179752$) из один-

Т а б л и ц а 4
Значения показателей F -статистик Райта

Локус	N_A	χ^2	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Ps</i> _1502048	7	125,567(21)***	0,001	0,038	0,037
<i>Ps</i> _80612	8	211,423(28)***	0,063	0,106	0,046
<i>Ps</i> _39709	4	4,851(6) ns	-0,034	0,014	0,046
<i>Ps</i> _25463	3	15,985(3)**	0,049	0,059	0,011
<i>Ps</i> _31489	2	0,013(1) ns	-0,040	-0,008	0,031
<i>Ps</i> _1179752	4	2,738(6) ns	-0,180	-0,076	0,089
<i>Ps</i> _1375177	3	91,612(3)***	-0,456	-0,421	0,024
<i>Ps</i> _718958	3	18,882(3)***	-0,050	0,099	0,142
<i>Ps</i> _30675	2	11,989(1)***	-0,297	-0,239	0,045
<i>Ps</i> _25981	3	13,269(3)**	-0,043	-0,022	0,020
<i>Ps</i> _364418	5	92,259(10)***	-0,111	-0,059	0,047
Среднее			-0,100 ± 0,047	-0,046 ± 0,047	0,049 ± 0,011

П р и м е ч а н и е. N_A – среднее число аллелей на локус; χ^2 – тест на гетерогенность аллельных частот (уровень значимости ns = not significant, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); F_{IS} – коэффициент инбридинга особи относительно популяции; F_{IT} – коэффициент инбридинга особи относительно вида; F_{ST} – коэффициент межпопуляционной дифференциации; ± – стандартная ошибка.

надцати полиморфных локусов наблюдаемые различия статистически недостоверны. У остальных локусов и по совокупности всех полиморфных локусов межпопуляционные различия по частотам аллелей высоко достоверны (см. табл. 4).

Количественная оценка степени генетических различий между популяциями с помощью генетического расстояния (D_N) Нея [Nei, 1972] показала, что, несмотря на невысокую генетическую дифференциацию (D_N варьирует от 0,019 до 0,061), различия между популяциями прослеживаются достаточно четко (табл. 5).

Наиболее близкими по генетической структуре оказались выборки К-6 и К-7, расположенные в низкогорной части восточного сектора Кузнецкого Алатау ($F_{ST} = 0,015$; $D_N = 0,019$). Максимальные различия в генетической структуре выявлены между единственной выборкой с западного сектора Кузнецкого Алатау — К-2 и всеми другими ($F_{ST} = 0,031$; $D_N = 0,045$).

Для выявления более точной картины генетических взаимоотношений между исследованными ценопопуляциями кедра сибирского посредством невзвешенного парногруппового метода кластерного анализа (UPGMA) была

Т а б л и ц а 5
Генетические расстояния D_N между изученными выборками *P. sibirica*

К-1	К-2	К-3	К-4	К-5	К-6	К-7	
***							К-1
0,048	***						К-2
0,027	0,052	***					К-3
0,038	0,061	0,030	***				К-4
0,038	0,050	0,026	0,041	***			К-5
0,034	0,049	0,022	0,027	0,028	***		К-6
0,033	0,055	0,030	0,025	0,024	0,019	***	К-7

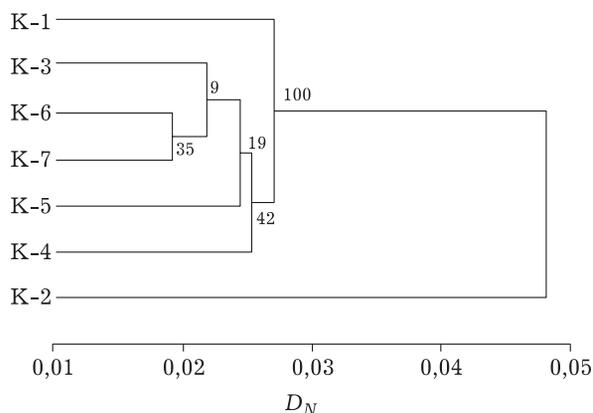


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма семи выборок *P. sibirica*, построенная на основании генетических расстояний М. Нея (D_N)

построена дендрограмма, позволяющая наглядно проиллюстрировать установленный уровень межпопуляционной дифференциации (рис. 2). Кластерный анализ данных также четко с высокой степенью достоверности отделил выборку К-2, относящуюся к западному сектору Кузнецкого Алатау, от других выборок восточного сектора. Выборки восточного сектора объединились в единый кластер, внутри которого наблюдаются низкие показатели индекса бустрепа – от 9 до 42 %.

Результаты исследования согласуются с аналогичными данными, полученными не только с использованием SSR-маркеров, разработанных для других видов сосен [Орешкова и др., 2014], но и с данными, полученными по другим генетическим маркерам для рода *Pinus* [Орешкова и др., 2017].

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генетического полиморфизма ценопопуляций *P. sibirica*, локализованных на относительно небольшом по площади, но контрастном по условиям произрастания участке Кузнецкого Алатау, выявил между ними биоэкологически значимые различия, имеющие выраженную микроэволюционную составляющую.

В соответствии с данными табл. 3 максимально высокий уровень генетической изменчивости установлен для ценопопуляционной выборки К-5, представленной деревьями, отличающимися высоким морфологическим разнообразием — с шарообразной, раскидистой и другими “световыми” формами кроны (см.

табл. 1). При этом для данного насаждения характерен и самый высокий коэффициент инбридинга, что, по-видимому, объясняется его территориальной и репродуктивной изоляцией от близлежащих кедровых массивов, отделенных от него березовыми криволесьями и караганово-злаковыми крутосклонами.

Наиболее низкие значения генетической изменчивости выявлены для двух ценопопуляций (К-6 и К-7), произрастающих в сходных экологических условиях низкогорного пояса Кузнецкого Алатау и расположенных, соответственно, вблизи автомобильной трассы на расстоянии около 10 км от пос. Орджоникидзевское и в окрестностях пос. Коммунар. Морфологически оба насаждения представлены типичными для вида деревьями, преимущественно с шатровыми и колоновидными формами кроны (см. табл. 1). Данные ценопопуляции *P. sibirica* подвержены значимому антропогенному воздействию, связанному с периодической вырубкой хозяйственно-ценных особей и высокой рекреационной нагрузкой. Выборка в непосредственной близости от пос. Коммунар (К-7) характеризуется не только самым низким показателем гетерозиготности, но и высоким значением коэффициента инбридинга, очевидно, также отражающим влияние антропогенного фактора в течение более чем 100-летнего существования данного населенного пункта на генетическую структуру ценопопуляции.

Проведенные ранее исследования *P. sibirica* в южно-таежной подзоне Западной Сибири показали, что деревья в так называемых “орехоплодных кедровых садах”, или припоселковых кедровниках, представляющих особый тип высокопродуктивных лесных экосистем, которые сформировались вблизи населенных пунктов при содействии местных жителей путем вырубки фаугных и дефектных особей, а также удаления примеси сопутствующих древесных видов, напротив, испытывают избыток гетерозигот, что, вероятно, является результатом длительной плюсовой селекции, проводимой населением [Орешкова и др., 2014]. Сравнительный анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что систематическое удаление из состава древостоя *P. sibirica* элитных деревьев приводит к обеднению генофонда и снижению селекционной ценности популяций, а вырубка слабо расту-

щих угнетенных особей способствует формированию плюсовых насаждений.

Оценка различий между ценопопуляционными выборками *P. sibirica*, согласно значению коэффициента инбридинга популяции относительно вида в целом, свидетельствует о значительном обособлении (индекс бутстрепа 100 %) одной из них (К-2) с западного сектора Кузнецкого Алатау относительно всех остальных, приуроченных к его восточному сектору (см. рис. 2). Насаждение К-2, единственное из всех изученных, относится к бассейну р. Томь, остальные — к бассейну р. Чулым. Насаждение К-2 дистанцировано от остальных изученных выборок водораздельным перевалом Кузнецкого Алатау на границе Республики Хакасия (восточный сектор) и Кемеровской области (западный сектор), занимаемым горно-тундровыми сообществами в сочетании с каменистыми осыпями и снежниками, выполняющими роль зоо- и гидрохорных барьеров для *P. sibirica*. Вероятно, это свидетельствует о проявлении у *P. sibirica* так называемого “бассейнового принципа популяционной дифференциации” [Санников, Санникова, 2007], обеспечиваемого комплексом орографических, фитоценологических, климатических и иных экологически значимых факторов микроэволюции.

В пользу данного предположения свидетельствует и визуализированная на UPGMA-дендрограмме (см. рис. 2) позиция выборки К-1, уровень дифференциации которой от остальных ценопопуляций восточного сектора Кузнецкого Алатау максимален (индекс бутстрепа 42 %). При этом территориально она наиболее приближена к Томь-Чулымскому водоразделу и, соответственно, к ценопопуляции К-2 (см. табл. 1). Несмотря на генетические различия, деревья в ценопопуляциях К-1 и К-2 представлены близкими по морфологии юбочными, флагообразными, шарообразными, куполообразными, раскидистыми, колоннообразными, многовершинными формами кроны, характерными для видов хвойных на верхней границе распространения.

При сравнении разновозрастных выборок (К-3 и К-4) из одной ценопопуляции *P. sibirica*, произрастающей в суровых высокогорных условиях, определяемых как горно-тундровые [Kharuk et al., 2013; Petrov et al., 2019], выявлено, что у ювенильных деревьев (К-4),

представляющих собой семенное потомство, все показатели генетической изменчивости снижены относительно взрослых материнских особей (К-3) (см. табл. 3). Некоторые авторы также указывают на избыток гетерозиготности у хвойных во взрослой части популяции за счет устранения гомозиготных особей [Крутовский и др., 1989]. В экстремальных местопроизрастаниях данная особенность, проявляющаяся у *P. sibirica* уже в первом поколении, может свидетельствовать о наличии процессов элиминации наименее адаптированных генотипов. Кроме того, снижение уровня генетического разнообразия у семенного потомства (К-4) может быть связано с недостатком пыльцы и эффектом самоопыления у материнских деревьев (К-3), произрастающих в высокогорье. По всей вероятности, поддержание характерного для вида уровня генетического разнообразия и устойчивой репродукции в ценопопуляциях из экстремальных условий произрастания возможно лишь за счет периодического заноса семян из более оптимальных экотопов. По отношению к выборке К-3 таковой является, очевидно, ценопопуляция К-5, имеющая сопоставимо высокие с ней значения показателей генетической изменчивости (см. табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования полиморфизма ДНК ценопопуляций *P. sibirica*, произрастающих в северо-восточной части Кузнецкого Алатау, выявлено их значительное генетическое разнообразие по ядерным микросателлитным локусам. Диагностированные различия в уровне генетического полиморфизма *P. sibirica* определяются в основном следующими факторами: 1) наличием между ценопопуляциями орографических и фитоценологических барьеров, обуславливающих направления векторов распространения семян вдоль водотоков бассейнов рек, формирующих р. Чулым в восточном секторе Кузнецкого Алатау и р. Томь — в западном; 2) значительным уровнем биоклиматической и экологической экстремальности местопроизрастаний данного вида в соответствии с высотой над уровнем моря; 3) антропогенной нагрузкой, включающей периодические рубки и рекреационное воздействие на расположенные вблизи

населенных пунктов ценопопуляции. Очевидно, что данные факторы, имеющие выраженную микроэволюционную составляющую, детерминируют адаптивные тренды ценопопуляций *P. sibirica*, морфологическое своеобразие и репродуктивный потенциал деревьев и, в конечном счете, контролируют их генетический полиморфизм в исследованной части Кузнецкого Алатау.

Авторы выражают искреннюю благодарность Рычиной Юлии Александровне, выпускнице магистерской программы “Геномика и биоинформатика” Базовой кафедры защиты и современных технологий мониторинга лесов СФУ, за участие в лабораторных исследованиях и помощь в обработке полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА

- Белоконов М. М., Политов Д. В., Мудрик Е. А., Полякова Т. А., Шатохина А. В., Белоконов Ю. С., Орешкова Н. В., Путинцева Ю. А., Шаров В. В., Кузьмин Д. А., Крутовский К. В. Разработка микросателлитных маркеров сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по результатам полногеномного *de novo* секвенирования // Генетика. 2016. Т. 52, № 12. С. 1418–1427 [Belokon M. M., Politov D. V., Mudrik E. A., Polyakova T. A., Shatokhina A. V., Belokon Yu. S., Oreshkova N. V., Putintseva Yu. A., Sharov V. V., Kuzmin D. A., Krutovsky K. V. Development of microsatellite genetic markers in Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour) based on the *de novo* whole genome sequencing // Russian Journal of Genetics. 2016. Vol. 52, N 12. P. 1263–1271.]
- Бущбом Ю., Ямбаев Ю. А., Деген Б., Габитова А. А. Динамика генетического разнообразия во времени в изолированной популяции дуба черешчатого *Quercus robur* L. (Fagaceae) // Генетика. 2012. Т. 48, № 1. С. 135–137 [Buschbom J., Yanbaev Y. A., Degen B., Gabitova A. A. Temporal dynamics of allelic diversity in isolated population of Pedunculate Oak *Quercus robur* L. (Fagaceae) // Russian Journal of Genetics. 2012. Vol. 48, N 1. P. 123–124.]
- Крутовский К. В., Политов Д. В., Алтухов Ю. П., Милютин Л. И., Кузнецова Г. В., Ирошников А. И., Воробьев В. Н., Воробьева Н. А. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями // Генетика. 1989. Т. 25, № 11. С. 2009–2032 [Krutovskii K. V., Politov D. V., Altukhov Yu. P., Milyutin L. I., Kuznetsova G. V., Iroshnikov A. I., Vorobyev V. N., Vorobyeva N. A. Genetic variability in Siberian Cedar pine. IV. Genetic diversity and differentiation between populations // Russian Journal of Genetics. 1989. Vol. 25, N 11. P. 1343–1362.]
- Мельникова М. Н., Петров Н. Б., Ломов А. А., La Porta N., Политов Д. В. Тестирование микросателлитных праймеров на разных популяциях евразийских елей *Picea abies* (L.) Karst. и *Picea obovata* Ledeb. // Генетика. 2012. Т. 48, № 5. С. 660–665 [Melnikova M. N., Petrov N. B., Lomov A. A., La Porta N., Politov D. V. Testing of microsatellite primers with different populations of Eurasian Spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb. // Russian Journal of Genetics. 2012. Vol. 48, N 5. P. 562–566.]
- Мудрик Е. А., Белоконов М. М., Белоконов Ю. С., Жулина Е. В., Политов Д. В. Генетическая изменчивость и доля перекрестного опыления *Pinus cembra* L. в Украинских Карпатах и Австрийских Альпах по аллозимным и микросателлитным локусам // Лесн. вестник. 2012. Т. 84, № 1. С. 112–117.
- Орешкова Н. В., Ветрова В. П., Горошкевич С. Н., Петрова Е. А. Изменчивость ядерных микросателлитных локусов в популяциях кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pallas) Regel) из российской части ареала // Генетика. 2017. Т. 53, № 3. С. 324–333 [Oreshkova N. V., Vetrova V. P., Goroshkevich S. N., Petrova E. A. Variability of nuclear microsatellite loci in the populations of Siberian dwarf pine (*Pinus pumila* (Pallas) Regel) from the Russian part of the range // Russian Journal of Genetics. 2017. Vol. 53, N 3. P. 338–347.]
- Орешкова Н. В., Седельникова Т. С., Пименов А. В., Ефремов С. П. Генетическая структура и дифференциация болотных и суходольных популяций сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по ядерным микросателлитным локусам // Генетика. 2014. Т. 50, № 9. С. 1059–1066 [Oreshkova N. V., Sedel'nikova T. S., Pimenov A. V., Efremov S. P. Analysis of genetic structure and differentiation of the bog and dry land populations of *Pinus sibirica* Du Tour based on nuclear microsatellite loci // Russian Journal of Genetics. 2014. Vol. 50, N 9. P. 934–941.]
- Петрова Е. А., Велисевич С. Н., Политов Д. В., Белоконов М. М., Белоконов Ю. С., Горошкевич С. Н. Распределение аллозимной изменчивости у кедр сибирского: три уровня разнообразия // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. XXVII, № 1–2. С. 160–168.
- Петрова Е. А., Горошкевич С. Н., Белоконов М. М., Белоконов Ю. С., Политов Д. В. Генетическое разнообразие кедр сибирского *Pinus sibirica* Du Tour: распределение вдоль широтного и долготного профилей // Генетика. 2014. Т. 50, № 5. С. 538 [Petrova E. A., Goroshkevich S. N., Belokon M. M., Belokon Yu. S., Politov D. V. Distribution of the genetic diversity of the Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour): along the latitudinal and longitudinal profiles // Russian Journal of Genetics. 2014. Vol. 50, N 5. P. 467–482.]
- Политов Д. В., Крутовский К. В., Алтухов Ю. П. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов // Генетика. 1992. Т. 28, № 1. С. 93–114 [Politov D. V., Krutovskii K. V., Altukhov Yu. P. Isozyme loci characteristics of gene banks of populations of cedar pines // Russian Journal of Genetics. 1992. Vol. 28, N 1. P. 76–95.]
- Санников С. Н., Санникова Н. С. Гипотеза гидрохорного расселения популяций хвойных древесных растений // Экология. 2007. № 2. С. 83–87 [Sannikov S. N., Sannikova N. S. The hypothesis of hydrochorous dissemination of populations of conifers // Russian Journal of Ecology. 2007. Vol. 38, N 2. P. 75–79.]
- Хемлебен В., Беридзе Т. Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес Р. Сателлитные ДНК // Успехи биол. химии. 2003. Т. 43. С. 267–306.

- Ando H., Emura N., Denda T., Nakahama N., Inoue-Murayama M., Isagi Yu. Development of microsatellite markers for the coastal shrub *Scaevola taccada* (Goodeniaceae) // Appl. Plant Sci. 2014. Vol. 2, N 5: 1300094. doi: 10.3732/apps.1300094
- Chakraborty R. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications // Ann. Human Genet. 1992. Vol. 56, N 1. C. 45–57.
- Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N., Neale D. B., Moran G. F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // Theoret. Appl. Genet. 1996. Vol. 92, N 6. P. 673–679.
- Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Ver. 3.2) // Cladistics. 1989. Vol. 5. P. 164–166.
- Guries R. P., Ledig F. T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. 1982. Vol. 36, N 2. C. 387–402.
- Kharuk V. I., Im S. T., Oskorbin P. A., Petrov I. A., Ranson K. J. Siberian pine decline and mortality in southern Siberian mountains // Forest Ecol. and Management. 2013. Vol. 310. P. 312–320.
- Liu Z.-L., Cheng Ch., Li J. High genetic differentiation in natural populations of *Pinus henrii* and *Pinus tabulaeformis* as revealed by nuclear microsatellites // Biochem. System. Ecol. 2012. Vol. 42. P. 1–9.
- Nei M. Genetic distance between populations // Am. Natur. 1972. Vol. 106. P. 283–292.
- Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Not. 2006. Vol. 6, N 1. P. 288–295.
- Petrov I. A., Shushpanov A. S., Golyukov A. S., Kharuk V. I. *Pinus sibirica* Du Tour response to climate change in the forests of the Kuznetsk Alatau Mountains // Sibirskij Lesnoj Zurnal (Sib. J. For. Sci.). 2019. N 5. P. 43–53.
- Salzer K., Sebastiani F., Gugerli F., Buonamici A. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L // Mol. Ecol. Res. 2009. Vol. 9, N 3. C. 858–861.
- StatSoft Inc., STATISTICA Data Analysis Software System, Version 8.0, 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 // Mol. Ecol. Not. 2004. N 4. P. 535–538.
- Vandelight K. K., Nkongolo K. K., Mehes M., Beckett P. Genetic analysis of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa* populations from stressed sites contaminated with metals in Northern Ontario (Canada) // Chem. Ecol. 2011. Vol. 27, N 4. P. 369–380.
- Wachowiak W., Stephan B. R., Schulze I., Prus-Glowacki W., Ziegenhagen B. A critical evaluation of reproductive barriers between closely related species using DNA markers — a case study in *Pinus* // Plant System. Evolut. 2006. Vol. 257. N 1–2. P. 1–8.
- Xiong B., Dong Sh., Qi J., Zhang L., Ha D., Ju Yu., Zhang Z. Development and characterization of microsatellite loci for *Lindera glauca* (Lauraceae) // Appl. Plant Sci. 2016. Vol. 4, N 11: 1600088. doi: 10.3732/apps.1600088

Genetic polymorphism of Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour) in Kuznetsk Alatau

N. V. ORESHKOVA^{1, 2, 3}, T. S. SEDEL'NIKOVA³, S. P. EFREMOV³, A. V. PIMENOV^{2, 3}

¹FRC KSC SB RAS
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28
E-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru

²Siberian Federal University
660041, Krasnoyarsk, pr. Svobodny, 79

³V. N. Sukachev Institute of Forest SB RAS
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28

The DNA polymorphism of 7 cenopopulations of Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour), growing in the region which is typical for mountain taiga pine forests — the north-eastern part of the Kuznetsk Alatau, was studied. According to the data of 11 nuclear microsatellite loci, 44 allelic variants, which significantly differed between the studied cenopopulations in composition and frequency of occurrence were identified. The highest level of allelic diversity is found in the Ps_80612, Ps_1502048 loci, in which 8 and 7 alleles were detected, respectively. The calculation of the main parameters of genetic diversity showed, on the whole, a relatively low level of polymorphism of the studied samples ($N_A = 3,078$; $N_E = 1,877$; $H_E = 0,445$; $H_O = 0,401$). An

analysis of the degree of subdivision of cenopopulations revealed that about 95 % of the total genetic diversity is concentrated within populations, while the interpopulation component accounts for only about 5 % ($F_{ST} = 0,049$). The diagnosed differences in the level of *P. sibirica* genetic polymorphism are determined by several factors: the presence of orographic and phytocenotic barriers between the coenopopulations which defined the directions of seed propagation vectors along the watercourses of river basins that formed the Chulym river in the eastern sector of the Kuznetsk Alatau and Tom river in the western sector; a significant level of bioclimatic and environmental extremeness of habitats of coenopopulations in accordance with the height above sea level; anthropogenic pressure, including periodic deforestation and recreational impact on coenopopulations located near settlements. These factors, which have a significant microevolutionary component, determine the adaptation trends of cenopopulations of *P. sibirica*, morphological singularities and reproductive potential of trees and, ultimately, control their genetic polymorphism in the studied part of the Kuznetsk Alatau.

Key words: *Pinus sibirica*, microsatellites, genetic diversity, heterozygosity, Kuznetsk Alatau.