

УДК 575.174.015.3

ВНУТРИВИДОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЛИСТВЕННИЦЫ КАЯНДЕРА НА СЕВЕРО-ВОСТОКЕ АЗИИ

© 2014 г. Н. В. Орешкова

Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН

660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

E-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Исследование внутривидовой генетической дифференциации лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi*) с помощью восьми ядерных микросателлитных локусов проведено на северо-востоке Азии – в Магаданской области и на п-ове Камчатка. SSR-анализ выявил высокий уровень генетического разнообразия. Значительные генетические различия между выборками из Магаданской области и Камчатки указывают на раннюю изоляцию лиственницы на полуострове.

Ключевые слова: лиственница Каяндера (*Larix cajanderi*), маркеры ядерного генома, полиморфизм, аллельное разнообразие, генетическая структура, внутривидовая дифференциация.

ВВЕДЕНИЕ

Лиственничные леса из лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr.) являются доминирующей формацией светлохвойной тайги на северо-востоке Азии. Вопросам географии и внутривидовой морфологической изменчивости лиственницы Каяндера в этом регионе посвящены многочисленные исследования (Бобров, 1972; Абаимов, Коропачинский, 1984; Коропачинский, Встовская, 2002; Нешатаева, 2009; Абаимов и др., 2010; Адрианова и др., 2011; Синельникова, Пахомов, 2011 и др.). Однако генетическая изменчивость и популяционная структура *L. cajanderi* в северо-восточной части ареала до сих пор остаются слабоизученными (Семерилов, Полежаева, 2007; Polezhaeva et al., 2010; Орешкова и др., 2013), а таксономический статус вида в этом регионе является предметом дискуссий.

Цель исследования – провести сравнительный анализ генетической изменчивости и внутривидовой дифференциации лиственницы Каяндера в Магаданской области и на п-ове Камчатка, используя ядерные микросателлитные (SSR) маркеры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужила хвоя, собранная с отдельных деревьев в 11 популяциях лиственницы с Камчатского края и в 4 популяциях из Магаданской области (табл. 1).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены с применением СТАВ-метода с некоторыми модификациями (Devey et al., 1996). Анализ генетического полиморфизма лиственницы Каяндера в исследованных регионах проводили с использованием микросателлитных локусов ядерной локализации (табл. 2).

Для полимеразной цепной реакции использовали набор реагентов для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген», содержащий ингибированную для «горячего старта» Taq ДНК полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния.

Продукты амплификации разделяли в 6%-м полиакриламидном геле с использованием трис-ЭДТА-боратного электродного буфера. Окраску геля проводили в растворе бромистого этидия с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. В качестве марке-

Таблица 1. Характеристика исследованных популяций лиственницы Каяндера

№ п/п	Код популяции	Географическое местоположение	Географические координаты
Магаданская область			
1	M1_Tord	Тенькинский р-н. Устье ручья 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.
2	M2_Orotuk	Тенькинский р-н, окрестности с. Оротук. Вторая надпойменная терраса р. Колымы вблизи впадения р. Бол. Тыэллах. Высота над ур. м. 482 м	62° 07' с. ш. 148° 30' в. д.
3	M3_Saturn	Тенькинский р-н. Устье ручья 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.
4	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.
Камчатский край			
5	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.
6	K2_M-Kim	Миловский р-н, Центральная Камчатская депрессия, долина р. Малая Кимитина. Высота над ур. м. 160 м	54° 58' с. ш. 158° 50' в. д.
7	K3_Koz1	Усть-Камчатский р-н, окр. 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.
8	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.
9	K5_Uks	Быстринский р-н, окр. 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.
10	K6_Taigz	Миловский р-н, окр. пос. Таежный. Центральная Камчатская депрессия, первая надпойменная терраса р. Камчатка. Высота над ур. м. 158 м	55° 17' с. ш. 159° 19' в. д.
11	K7_Gorn	Быстринский р-н, предгорье Быстринского хребта, долина р. Быстрая, урочище Горный Ключ. Высота над ур. м. 268 м	55° 57' с. ш. 159° 12' в. д.
12	K8_Ikar	Быстринский р-н, восточный макросклон Срединного хребта, окр. оз. Икар. Высота над ур. м. 556 м	55° 52' с. ш. 158° 41' в. д.
13	K9_Atl	Миловский р-н, Центральная Камчатская депрессия, окр. пос. Атласово. Высота над ур. м. 90 м	55° 49' с. ш. 159° 25' в. д.
14	K10_Koz2	Усть-Камчатский р-н, окр. пос. Козыревск. Центральная Камчатская депрессия. Высота над ур. м. 45 м	56° 03' с. ш. 159° 54' в. д.
15	K11_Krap	Быстринский р-н, окр. пос. Крапивная. Высота над ур. м. 220 м	55° 54' с. ш. 159° 34' в. д.

Таблица 2. Характеристика микросателлитных локусов, отобранных для исследования внутривидовой дифференциации лиственницы Каяндера

Локус	Мотив	Температура отжига, °C	Литературный источник
<i>bcLK056</i>	(AG) ₂₀	Touchdown 63-53	Isoda, Watanabe, 2006
<i>bcLK066</i>	(TG) ₁₂		
<i>bcLK224</i>	(AG) ₁₇		
<i>bcLK260</i>	(TG) ₁₄ (AG) ₉		
<i>bcLK232</i>	(AG) ₁₉		
<i>bcLK235</i>	(TC) ₉ (AC) ₂ AG(AC) ₁₄	58	Chen et al., 2009
<i>UBCLXtet-1-22</i>	(TATC) ₉ (TA) ₁₂		
<i>UAKLly6</i>	(GT) ₁₇		

ра стандартных длин использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанной рестриктазой Hpa II.

Для обнаружения и исключения возможных вариантов ошибок генотипирования микросателлитных локусов использована программа MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004).

Показатели генетического разнообразия оценивали с помощью программы GenAlEx 6.41 (Peakall, Smouse, 2006). Кластеризацию по методу невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) и по методу ближайшего связывания (Neighbor Joining) с оценкой бутстреп-поддержки узлов ветвления проводили в модулях пакета программ PHYLIP v 3.2 (Felsenstein, 1989) и STATISTICA-8 (StatSoft, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования ядерных микросателлитных локусов в 15 популяциях лиственницы Каяндера из районов Камчатского края и Магаданской области

выявлено 54 аллельных варианта, почти половина (46,3 %) из которых оказались общими. Исследованные популяции различались по составу и частотам аллелей микросателлитных локусов (см. табл. 2). В магаданских популяциях *L. cajanderi* выявлено 18 специфических аллелей, а в камчатских – лишь 9. В целом же аллельное разнообразие магаданских популяций оказалось выше – 43 аллеля, в камчатских популяциях всего 36 аллелей. Локус *bcLK232* у лиственницы Каяндера в Камчатском крае оказался мономорфным, тогда как в магаданских популяциях у него выявлено 3 аллельных варианта.

Расчеты основных параметров генетической изменчивости (табл. 3) показали, что лиственница Каяндера из районов Камчатки обладает меньшим уровнем генетической изменчивости ($N_A = 3.489$; $N_E = 2.030$; $H_O = 0.383$; $H_E = 0.440$) по сравнению с выборками из Магаданской области ($N_A = 4.531$; $N_E = 2.624$; $H_O = 0.528$; $H_E = 0.523$).

Средние значения основных показателей генетического полиморфизма ($N_A = 3.767$;

Таблица 3. Основные показатели генетической изменчивости лиственниц Каяндера, рассчитанные по результатам SSR-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± ±0.141	2.030± ±0.075	0.383± ±0.021	0.440± ±0.023	0.138± ±0.011
Магаданская область						
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± ±0.246	2.624± ±0.225	0.528± ±0.039	0.523± ±0.040	-0.029± ±0.026
В среднем для всех изученных популяций		3.767± ±0.129	2.191± ±0.085	0.422± ±0.020	0.463± ±0.020	0.089± ±0.014

Примечание. 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, ± – стандартная ошибка.

$N_E = 2.191$; $H_O = 0.422$; $H_E = 0.463$) 15 популяций лиственницы Каяндера в исследованных районах (см. табл. 3) близки к аналогичным показателям, приведенным в работах для *L. lyallii* Parl. и *L. occidentalis* Nutt. (Khasa et al., 2000; Chen et al., 2009), *L. kampeferi* Sarg. (Isoda, Watanabe, 2006), для *L. sibirica* Ledeb., *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr. и *L. cajanderi*, четыре камчатские выборки которой были проанализированы по меньшему числу локусов (Орешкова и др., 2013).

Сопоставление наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности показало, что во всех популяциях лиственницы Каяндера из Камчатки выявлен дефицит гетерозиготных генотипов ($F = 0.138$; $\chi^2 = 651.433$ (73)***), тогда как в популяциях лиственницы из Магадана выявлен избыток гетерозигот ($F = -0.029$; $\chi^2 = 437.691$ (88)**).

Анализ популяционной структуры вида в исследованных регионах с помощью F -статистик Райта (Wright, 1965; Guries, Ledig, 1982) показал, что в среднем каждое дерево в изученных популяциях *L. cajanderi* обнаруживает почти 7%-й дефицит гетерозиготных генотипов ($F_{IS} = 0.068$) относительно популяции и почти 17 % дефицит гетерозигот ($F_{IT} = 0.176$) относительно вида в целом.

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 выявленное усредненное значение показателя F_{ST} вносят популяции лиственницы Каяндера из Камчатского края (табл. 4).

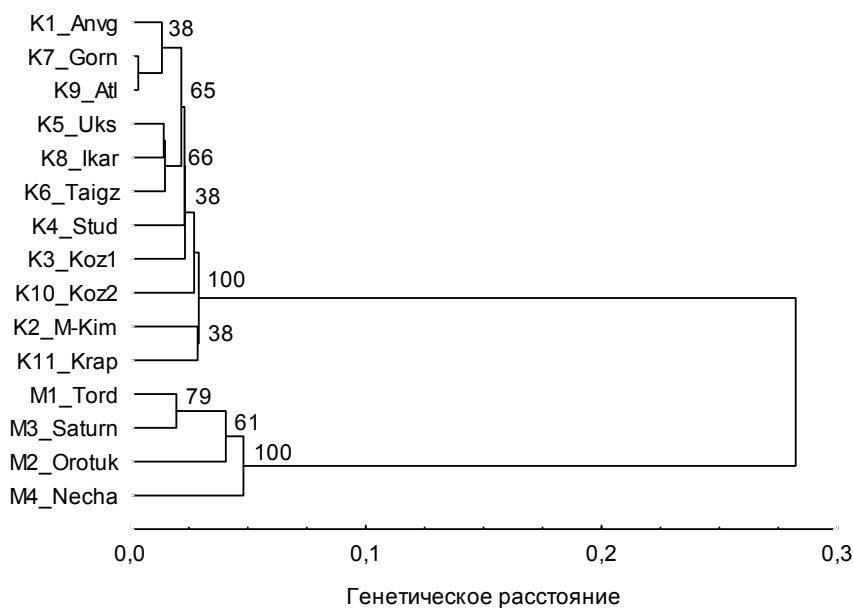
На основании частот аллелей восьми ядерных микросателлитных локусов проведена количественная оценка степени генетических различий (D_N) между исследованными популяциями (Nei, 1972). Значения генетических расстояний (D_N) между популяциями варьируют в широких пределах – от 0.004 до 0.458. Невысокие генетические отличия установлены внутри каждого района исследования: между популяциями из Магаданской области ($F_{ST} = 0.026$; $D_N = 0.051$), между популяциями из Камчатки ($F_{ST} = 0.039$; $D_N = 0.035$). Генетическая дифференциация исследованных двух групп популяций соответствует их географической удаленности друг от друга. Наибольшая дифференциация лиственницы Каяндера выявлена между популяциями из разных районов исследования ($F_{ST} = 0.117$; $D_N = 0.362$). Согласно тесту Мантела (Mantel, 1967), выявленные значения генетического расстояния (D_N) показали четкую корреляцию с географическими дистанциями ($R = 0.981$, $P = 0.01$).

Построенная на основе матрицы генетических дистанций Nei UPGMA-дендрограмма (см. рисунок) четко показывает группировку изученных популяций лиственниц Каяндера из Камчатского края и Магаданской области.

На дендрограмме выделяются два кластера. В первый кластер с бутстреп-поддержкой в 100 % вошли все камчатские популяции. Второй кластер объединил популяции лиственницы из Магаданской области также с бутстреп-поддержкой в 100 %. Между этими кластерами, как уже отмечено, наблюдаются серьезные различия по составу и частотам исследованных ядерных микросателлитных

Таблица 4. Значения F -статистик Райта, рассчитанные отдельно по каждому из изученных районов

Локус	Камчатский край			Магаданская область		
	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



UPGMA-дендрограмма генетических расстояний между изученными популяциями лиственниц, построенная на основании SSR-анализа.

локусов. Генетическая дистанция между ними – 0.362, отражает в целом 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, по всей видимости, оказывает экологическая гетерогенность среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование маркеров ядерного генома (SSR-анализ) позволило получить качественно новые данные по оценке уровня генетического разнообразия и дифференциации лиственницы Каяндера из Камчатского края и Магаданской области. В результате проведенного исследования установлено, что магаданские популяции лиственницы существенно отличаются от камчатских как по уровню генетического разнообразия, так и по генетической структуре. В первую очередь эти различия говорят о существенном расхождении процессов микроэволюции и расселении лиственницы Каяндера в приокеанических и континентальных районах северо-востока Азии. Полученные результаты, говорящие о значительной дифферен-

циации лиственницы из Магаданской области и Камчатского края, согласуются с данными, полученными ранее по другим генетическим маркерам (Абаимов и др., 2010; Орешкова, 2012; Polezhaeva et al., 2010).

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

Автор выражает благодарность сотрудникам Камчатского филиала Тихоокеанского института географии ДВО РАН В. П. Ветровой и Н. В. Казакову за помощь в сборе материала на территории п-ова Камчатка, а также сотруднику Института биологических проблем Севера ДВО РАН Н. В. Синельниковой за предоставленный материал из Магаданской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абаимов А. П., Адрианова И. Ю., Артюкова Е. В. и др. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России. Новосибирск: Изд-во «ГЕО», 2010. 160 с.
- Абаимов А. П., Коропачинский И. Ю. Лиственницы Гмелина и Каяндера. Новосибирск: Наука, 1984. 121 с.
- Адрианова И. Ю., Васюткина Е. А., Крестов П. В. Эколого-географическая изменчивость генеративных органов лиственни-

- цы 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., Белоконь М. М., Жамгянсурен С. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 204–213.
- 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. Колыма) // Turczanowia. 2011. № 14(3). С. 2–68.
- Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T. et al. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) // Mol. Ecol. Res. 2009. V. 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. V. 92. N. 6. P. 673–679.
- Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2) // Cladistics. 1989. V. 5. P. 164–166.
- Guries R. P., Ledig F. T. Gene diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. 1982. V. 36. P. 387–402.
- Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Mol. Ecol. 2006. V. 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.
- Khasa D. P., Jaramillo-Correa J. P., Jaquish B. et al. Contrasting microsatellite variation between subalpine and western larch, two closely related species with different distribution patterns // Mol. Ecol. 2006. V. 15, I. 13. P. 3907–3918.
- Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Research. 1967. N. 27. P. 209–220.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. V. 106. P. 283–291.
- Peakall R., Smouse P. E. GenA1Ex V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Not. 2006. V. 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 // Mol. Ecol. 2010. V. 19. P. 1239–1252.
- 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. 353–538.
- Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. 1965. V. 19. P. 355–420.

Intraspecific Genetic Differentiation of the Cajanderi Larch (*Larix cajanderi*) in the North-East Asia

N. V. Oreshkova

*V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation
E-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru*

The study of intraspecific genetic differentiation of the Cajanderi larch (*Larix cajanderi*) was carried out in the north-east of Asia – in Magadan region and on the Kamchatka Peninsula. Genetic diversity of the larch was investigated using eight nuclear microsatellite loci. SSR analysis revealed high level of genetic diversity of the Cajanderi larch in the Far North-East of Asia. Significant genetic differences between *L. cajanderi* samples from Magadan region and Kamchatka suggests early isolation of the larch on the peninsula.

Key words: *Cajanderi larch (Larix cajanderi), markers of a nuclear genome, allelic variants, genetic structure, intraspecific differentiation.*