

На правах рукописи



Полежаева Мария Алексеевна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ И БИОГЕОГРАФИЯ ЛИСТВЕННИЦ
(*LARIX MILL.*, PINACEAE) ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ**

03.00.05 – ботаника

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте экологии растений и животных Уральского отделения РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Семериков Владимир Леонидович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Санников Станислав Николаевич

доктор биологических наук, профессор

Мухин Виктор Андреевич

Ведущая организация

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится « 6 » апреля 2010 г. В ____ часов на заседании диссертационного совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений животных УрО РАН по адресу: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

Факс: 8 (343) 260-82-56; E-mail: dissovet@ipae.uran.ru

URL: <http://www.ipae.uran.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии растений и животных УрО РАН.

Автореферат разослан « » марта 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Золотарева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Лиственница – одна из важнейших в экологическом и экономическом отношениях бореальных хвойных пород нашей страны и основная лесобразующая порода на территории Дальнего Востока России.

Род *Larix* считается относительно молодым. Для исследуемой территории описывается большое число гибридных, окончательно несформировавшихся таксонов, чей видовой статус является спорным. Поэтому особенно актуально изучение истории формирования ареалов и генетического разнообразия видов этого региона.

Использование молекулярно-генетических маркеров в изучении лиственниц Сибири (Semerikov, Lascoux, 2003; Семериков и др, 2007; Phylogeography of *Larix sukaczewii* Dyl., 2008; Phylogeography of Eurasian *Larix*, 2008) позволило выявить, что современное распределение генетической изменчивости таких видов, как *L. sukaczewii* Dyl., *L. sibirica* Ledeb. и *L. gmelinii* Rupr. сформировано событиями плейстоценовых вымираний и реколонизации северных частей таежной зоны из южных ледниковых рефугиумов. Генетические исследования лиственниц Дальнего Востока также проводились как с помощью аллозимных маркеров (Потенко, Разумов, 1996; Гончаренко, Силян, 1997; Semerikov et al., 1999; Ларионова и др, 2004), так и ДНК маркеров (Conflicting phylogenies..., 2003; Semerikov, Lascoux, 2003; Лёвина, Адрианова, 2003; Генетическая изменчивость и взаимоотношения..., 2004; Генетическая изменчивость и популяционная..., 2004; Изучение генетической изменчивости..., 2008; Васюткина, 2009; Орешкова, Барченков, 2009; и др.). Главным образом, данные работы были посвящены внутривидовой изменчивости и основывались на ограниченном материале, недостаточном для биогеографических заключений. Таким образом, большое значение имеет изучение дальневосточных видов лиственниц на протяжении всего их ареала с привлечением большого количества выборок и комплекса маркеров, позволяющих выявить генезис популяций лиственниц в разных географических зонах, роль гибридизации в их видообразовании и генетическую изменчивость.

Цель и задачи исследования.

Цель работы – изучение биогеографии лиственниц, произрастающих на территории Дальнего Востока России, на основе структуры генетической изменчивости цитоплазматических маркеров.

В задачи исследования входило:

- 1) исследование изменчивости митохондриальной и хлоропластной ДНК в популяциях дальневосточных лиственниц;
- 2) определение параметров внутри- и межпопуляционной изменчивости и географической структуры генетической дифференциации по двум типам генетических маркеров в популяциях дальневосточных лиственниц;
- 3) выявление позднеплейстоценовых областей сохранения древесной растительности и путей миграции лиственницы на территории Дальнего Востока.

Защищаемые положения:

1. Уровень изменчивости маркеров митохондриальной и хлоропластной ДНК исследованных популяций лиственниц в основном обусловлен историческими событиями и находится в пределах изменчивости этих маркеров у видов сем. Pinaceae.

2. Географическая структура изменчивости маркеров хлоропластной и митохондриальной ДНК указывают на обособленное генетическое положение лиственниц крайнего северо-востока Азии и, в частности, Камчатки, что обусловлено изоляцией их популяций в период последнего максимума оледенения в пределах современных ареалов.

3. Генетическое разнообразие лиственниц юга Дальнего Востока обусловлено относительно стабильными размерами их популяций даже в ледниковые фазы и возможностью генетических потоков между континентальной частью и близлежащими островами.

Научная новизна. Впервые с использованием маркеров хлоропластной и митохондриальной ДНК на обширном материале исследована генетическая изменчивость лиственницы континентального северо-востока Азии и о.Сахалина. Выявлена генетическая самостоятельность *Larix cajanderi* Mayr. и родственные связи лиственниц юга о.Сахалин с японской лиственницей *L. kaempferi* Lamb. Впервые исследована изменчивость цитоплазматических генетических маркеров в популяциях лиственницы Камчатки и Курильских островов (о.Шикотан и о.Итуруп). Проведено сравнительное исследование изменчивости цитоплазматических генетических маркеров на территории Восточной Сибири и Дальнего Востока с привлечением большого числа выборок.

Практическая значимость. Полученные данные о внутривидовой генетической изменчивости и географической дифференциации дальневосточных лиственниц могут быть использованы при разработке селекционных мероприятий и программ сохра-

нения биоразнообразия лесных генетических ресурсов, для дальнейших популяционно-таксономических исследований лиственниц, для преподавания биологических в вузах.

Личный вклад соискателя. Автором выполнена работа по сбору полевого материала на территории Магаданской, Сахалинской, Камчатской областей и Хабаровского края. Работа по лабораторному анализу материала, в том числе предоставленного руководителем, обобщению и интерпретации полученных данных выполнена автором самостоятельно.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на трёх конференциях молодых ученых в ИЭРиЖ УрО РАН (Екатеринбург, 2007, 2008, 2009); на международном симпозиуме «Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics» (Владивосток, 2007); на Всероссийской конференции в рамках XII съезда Русского Ботанического Общества «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века» (Петрозаводск, 2008); международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2009» (Минск, Белоруссия, 2009); на V съезде ВОГиС (Москва, 2009); на 2-м международном совещании по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири (Новосибирск, 2009).

Публикации. Основные результаты исследований опубликованы в 9 работах, в том числе в 2 статьях в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 137 страницах, содержит 13 рисунков и 10 таблиц и 3 приложения. Список литературы включает 230 источников, 126 из которых на иностранном языке.

Благодарности. Автор благодарит научного руководителя д.б.н. В.Л. Семерикова за помощь в проведении экспериментальных работ и обсуждение результатов, а также С.А. Семерикову за ценные замечания в ходе подготовки диссертации. Автор выражает искреннюю благодарность А.Н. Беркутенко, администрации Института биологических проблем Севера ДВО РАН, а также сотрудникам лесхозов Сахалинской области за помощь в организации сбора экспериментального материала.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе рассматриваются биологические особенности рода *Larix*, различные точки зрения, касающиеся его эволюции, общие принципы систематического деления. Дается краткая характеристика исследуемых видов. Отмечается, что у лиственниц

дальневосточного региона широко распространены процессы естественной гибридизации. Приводится обзор зарубежных и отечественных работ по изучению разнообразия, дифференциации и родственных связей видов *Larix*. Особое внимание уделяется исследованиям дальневосточных видов с помощью молекулярно-генетических маркеров. Отдельные разделы посвящены особенностям палеогеографии и характеристике типов растительности, распространенных на территории исследуемого региона в последний ледниковый максимум (ПЛМ, 18-20 тыс.л.н.). Также рассматривается влияние динамики численности популяций видов под действием климатических флуктуаций на величину и структуру их генетического разнообразия. Обосновываются преимущества использования унипарентально наследуемых маркеров в биогеографических исследованиях.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Видовой состав, характеристика и локализация выборок. Изучены 54 выборки из популяций лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока. Семь выборок с о.Сахалин и Курильских островов (о.Шикотан и о.Итуруп) собраны из области распространения *L. kamtschatica* (Rupr.) Carr. (= *L. kurilensis* Mayr.). Из мест произрастания *L. olgensis* A.Henry – 4 популяции: три из Приморья и одна из Кореи. Из основной части ареала *L. gmelinii* (Rupr.) Rupr. – 11 популяций, включая центральную Якутию, Амурскую область, Хабаровский край, Читинскую область и Бурятию. Из мест описания гибридной *L. ×czekanowskii* Szaf. (*L. gmelinii* × *L. sibirica* Ledeb.) – 5 популяций с севера Красноярского края. Большую часть ареала *L. cajanderi* Mayr представляет 21 выборка с северо-востока Азии, включая северо-восток Хабаровского края, восточную Якутию, Магаданскую область, Чукотский АО. Популяции лиственницы Камчатского края отнесены к подвиду *L. kurilensis* ssp. *glabra* Dylis. Выборка японской лиственницы *L. kaempferi* (Lamb.) Carriere (= *L. leptolepis* Siebold & Zucc.) взята из лесокультурных посадок Тамаринского лесхоза (южный Сахалин).

2.2 Материалы и методы, использованные в анализе генетической изменчивости хлоропластных микросателлитов и маркеров митохондриальной ДНК. Геномную ДНК выделяли методом СТАБ из свежей хвои/камбия, высушенной в силикагеле хвои или из проростков. Для анализа изменчивости хлоропластной ДНК (хпДНК) использовано пять микросателлитных маркеров (cpSSR): Pt26081 (A set of primers..., 1996) и четыре, разработанных нами (Полежаева, Семерилов, 2009). Продукты амплификации подвергались электрофорезу в 6% полиакриамидном денатурирующем геле с последующим серебряным окрашиванием. Аллели обозначали по разнице в

числе повторов: наиболее короткому из фрагментов присваивался номер 1, фрагменту длиннее на один нуклеотид – 2, и т.д. Комбинация аллелей всех локусов рассматривалась как хлоротип (хлоропластный гаплотип).

Изменчивость митохондриальной ДНК (мтДНК) изучали по четырем полиморфным маркерам: интронам генов *nad5*(1-2г) и *nad4*(3с-4г) (Dumolin-Laregue, 1997), некодирующему фрагменту *UBC460* (RAPD-derived..., 2006) и фрагменту фланкирующей области гена *atpA* (маркер разработан нами, не опубликован). Полиморфизм *UBC460* выявлялся непосредственно после ПЦР электрофорезом в агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Изменчивость остальных фрагментов выявлялась после обработки ферментами (PCR-RFLP-маркеры) электрофорезом в 6% полиакриламидном денатурирующем геле. Сочетание аллелей в четырех локусах митохондриальной ДНК определялось как митотип (митохондриальный гаплотип).

Для оценки уровня внутривидового генетического разнообразия рассчитывали следующие показатели: общее число гаплотипов (N_0), эффективное число гаплотипов (N_e), параметр внутривидовой изменчивости (H), стандартизованное разнообразие гаплотипов в популяции $r(g)$, которое оценивает ожидаемое число гаплотипов в популяции при заданном размере выборки, установленном в данном исследовании как 7 (подсчитывали только для cpSSR маркеров). Иерархическое распределение генетической изменчивости внутри популяций, между ними и между группами популяций, сформированными по таксономическому принципам, оценивалась анализом AMOVA с использованием программы Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2006). Генетическая подразделенность популяций определялась по величине индексов фиксации: G_{ST} , на основе частот гаплотипов в популяциях без учета информации о степени их сходства, и R_{ST} (cpSSR -маркеры) или N_{ST} (митохондриальные маркеры), которые вычисляются с учетом сходства между гаплотипами. Сравнение G_{ST} и R_{ST} (N_{ST}) (тест на филогеографическую структуру) проводили по алгоритму (Pons, Petit, 1995) в программе Permut. Парные R_{ST} и N_{ST} использовались в качестве межпопуляционных генетических дистанций. Для cpSSR-маркеров пространственная генетическая структура анализировалась методом главных координат (PCA) в программе NTSYS-pc (Rohlf, 1988); для митохондриальных маркеров группировка популяций, кроме как по таксономическому критерию, осуществлялась также методом SAMOVA (Dupanloup et al, 2002). Изоляция расстоянием для обоих типов маркеров анализировалась тестом Мантел (Mantel, 1967). Генетический поток для обоих гаплоидных маркеров оценивали на основе «островной модели» по формуле $Nm = [(1 - F_{ST}) / 2 F_{ST}]$ (Takahata, Palumbi, 1985).

ГЛАВА 3. ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ У ВИДОВ

LARIX ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

3.1 Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК. Внутрипопуляционная изменчивость. Суммарно найдено 29 аллелей. Семь аллелей обнаружено в локусе Pt26081, шесть – в локусах L-Pt30204 и L-Pt9393, L-Pt9891, и четыре – в микросателлите фрагмента L-trn*LV*. В каждом локусе преобладающими были 3-4 аллеля с унимодальным распределением их частот. Сочетание размерных вариантов в локусах у 1004 особей позволило выявить 115 хлоротипов, 51 из которых был уникальным (встретился однажды).

Таблица 1 - Средние по видам показатели полиморфизма маркеров хпДНК и мтДНК в исследованных популяциях *Larix*

Виды	хпДНК					мтДНК			
	<i>n</i>	N_o	N_e	<i>H</i>	$r(7)$	<i>n</i>	N_o	N_e	<i>H</i>
<i>L. kurilensis</i> <i>ssp.glabra</i>	20 ±0	5 ±0	1.8 ±0.1	0.473 ±0.045	2.7 ±0.1	20 ±0	1 ±0	1 ±0	0
<i>L.cajanderi</i>	22.58 ±9.07	9.05 ±3.5	5.7 ±2.67	0.824 ±0.12	4.7 ±1.0	20.84 ±8.3	1.16 ±0.4	1 ±0.1	0.026 ±0.1
<i>L. gmelinii</i>	17.31 ±6.57	9.06 ±2.74	5.5 ±1.67	0.864 ±0.05	5.0 ±0.5	16.69 ±6.6	2.06 ±0.4	1.5 ±0.3	0.306 ±0.2
<i>L. × czekanowskii</i>	10.6 ±3.0	7.6 ±0.9	5.4 ±1.9	0.888 ±0.085	5.6 ±0.8	10 ±1.9	1.4 ±0.5	1 ±0.5	0.218 ±0.298
<i>L. kamtschatica</i>	21.43 ±2.44	10.14 ±1.95	5.9 ±2.01	0.838 ±0.12	4.9 ±0.8	20.86 ±2.9	2.86 ±2.1	2 ±1.1	0.302 ±0.4
<i>L.olgensis</i>	11.75 ±1.89	8.5 ±1.29	5.71 ±2.96	0.848 ±0.16	3.2 ±1.4	12 ±2.2	2.25 ±1.5	2 ±1.2	0.340 ±0.4
<i>L.kaempferi</i>	8	4	2.9	0.750	3.8	8	1	1	0
Среднее по всем популяциям	18.6 ±7.8	8.8 ±2.88	5.4 ±2.26	0.831 ±0.123	4.8 ±0.96	18 ±7.3	1.7 ±1.07	1 ±0.62	0.184 ±0.248
Всего	1004	115				956	11		

Примечание - *n* – средний размер популяционной выборки, N_o – среднее число хлоротипов/митотипов в популяции, N_e – среднее эффективное число хлоротипов/митотипов, *H* – среднее значение параметра внутрипопуляционной изменчивости, $r(7)$ – среднее стандартизованное разнообразие хлоротипов в популяции (на выборку в 7 особей), ± – стандартное отклонение.

Средние оценки разнообразия по видам примерно одинаковы (табл.1), однако по всем изученным популяциям значительно варьируют. Почти во всех выборках присутствуют уникальные и редкие хлоротипы. Показатель общего количества хлоротипов (N_o) варьировал от 3 до 18. Параметры оценки изменчивости, учитывающие размер выборки: эффективное число хлоротипов (N_e) изменялось от 1.7 до 12.2; *H* – от 0.441 до 0.977. Число хлоротипов при стандартизованном размере выборки в 7 особей изменялось от 2.6 до 6.5, составляя в среднем 4.8. Большинство исследованных популяций характеризуется высокими значениями параметров внутрипопуляционной изменчивости ($N_e > 2.4$; $H > 0.645$; $r(7) > 3.4$). Однако низкие показатели изменчивости ($N_e = 1.7-2.4$; $H = 0.441 - 0.645$; $r(7) = 2.6-3.4$) наблюдаются в некоторых популяциях с северного побережья Охотского моря (№5), из Якутии (№ 19), Чукотки (№ 4), Камчатки (№ 1, 2), юга

Приморья (№ 51), а также с о.Шикотан (№ 49) (расположение популяций см. на рис. 2-Б). Вероятнее всего это связано с дрейфом генов в результате резкого сокращения численности и длительной изоляции популяций, повлекшими за собой потерю генетической изменчивости в ходе неблагоприятных климатических фаз (например, в выборке из окрестностей г. Магадан из шести обнаруженных хлоротипов один достигает частоты 70.8%, что указывает на событие «бутылочного горлышка» в истории этой популяции).

3.2 Межпопуляционная и пространственная дифференциация. Географическое распространение девяти наиболее частых хлоротипов отражает генетические связи между популяциями на изученной территории (рис. 1).

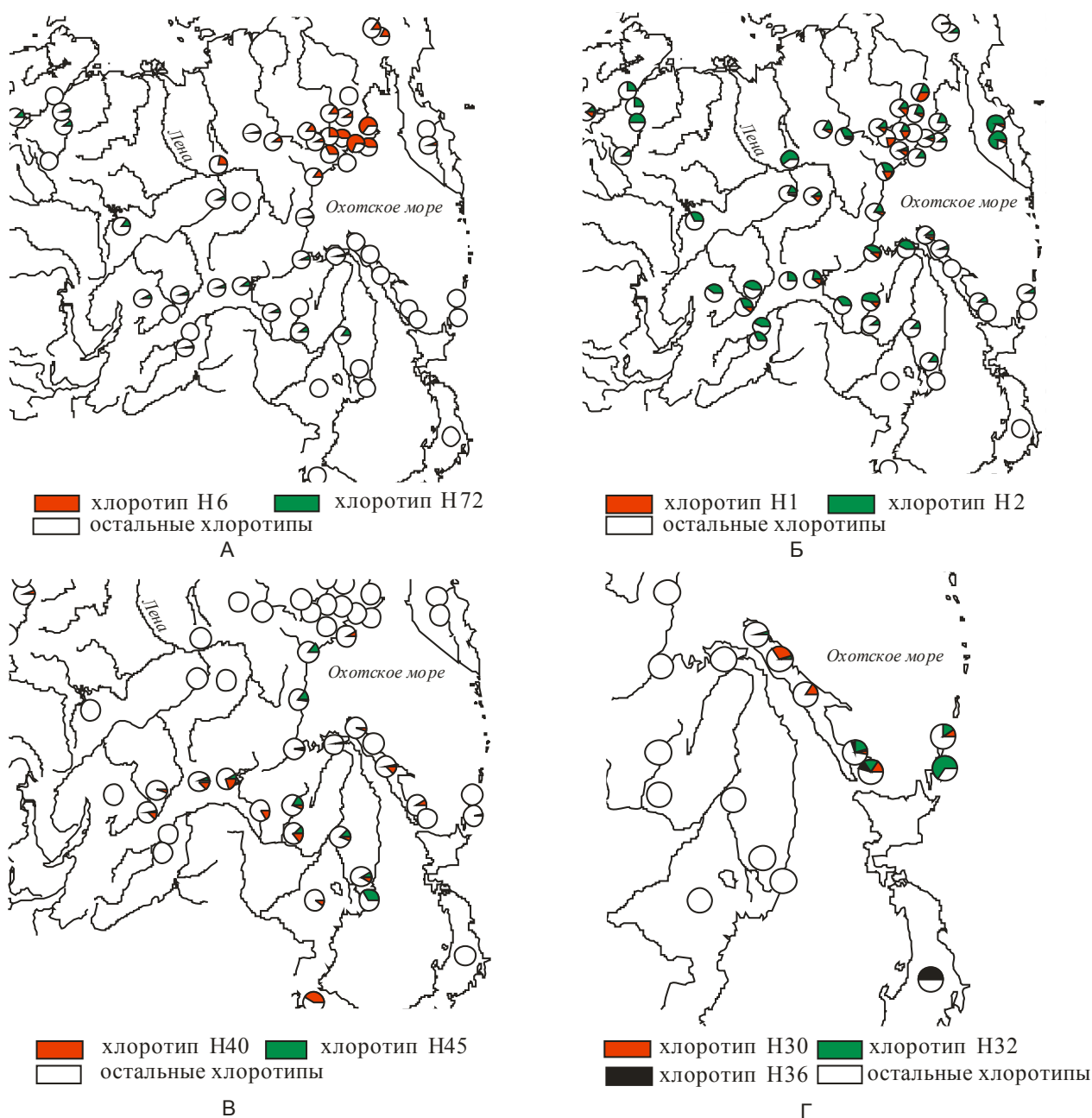


Рисунок 1 - Географическое распределение избранных хлоротипов. А: хлоротипов H6 и H72; Б: хлоротипов H1 и H2; В: хлоротипов H40 и H45; Г: хлоротипов H30, H32 и H36.

Так, хлоротип H6 распространен только на северо-востоке изученного региона

к востоку от Верхоянского хребта, в то время как хлоротип Н72, наоборот, встречается в выборках Восточной Сибири к западу от него, отсутствуя на юге Дальнего Востока (рис. 1-А). Хлоротипы Н1 и Н2 наиболее распространены и встречаются на всей изученной территории (рис. 1-Б). Хлоротипы Н40 и Н45 встречаются в основном на юге Дальнего Востока и вдоль западного побережья Охотского моря (рис. 1-В). Хлоротипы Н30, Н32 и Н36 специфичны для выборок с Сахалина, Курильских островов и выборки *L. kaempferi* (рис. 1-Г).

Индексы дифференциации изменчивости хпДНК составили: $G_{ST} = 0.144$; $R_{ST} = 0.432$, причем R_{ST} значимо превышало G_{ST} ($P < 0.001$), указывая на наличие филогеографической структуры. По результатам анализа молекулярной изменчивости AMOVA в доле общей изменчивости cpSSR локусов при учете родства хлоротипов 31.74% изменчивости распределено между семью таксонами, 11.48% соответствует межпопуляционным различиям, большая же часть изменчивости – 56.79% распределена внутри популяций. Дополнительный анализ, проведенный для проверки самостоятельности таксона *L. cajanderi*, выявил его значительную дифференциацию как от всех остальных изученных видов ($R_{CT} = 20.3\%$), так и от *L. gmelinii* ($R_{CT} = 24.87\%$). Тест Мантела выявил значимую корреляцию между парными генетическими (R_{ST}) и географическими дистанциями ($r = 0.36$, $P < 0.05$).

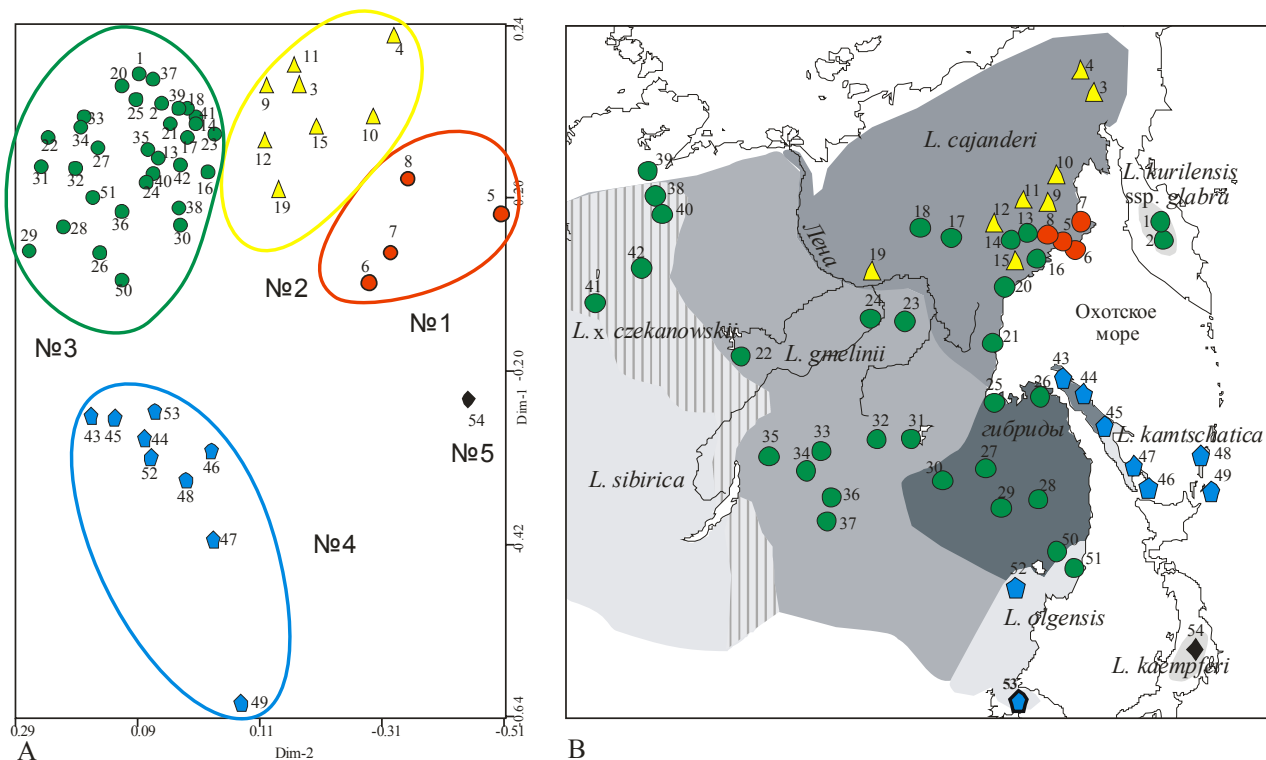


Рисунок 2 - Изменчивость хпДНК исследованных популяций *Larix*. А: Ординация популяций в плоскости главных координат (РСА), в качестве дистанций между популяциями использованы значения парных R_{ST} . Б: Географическое распределение групп популяций

В плоскости главных координат популяции образовали четыре группы, выборка японской лиственницы расположилась отдельно (рис. 2). Первая ось четко отделила *L.*

kamtschatica и две выборки ольгинской лиственницы от всех остальных видов. Вторая ось выявила географическую структурированность в пределах ареала *L. cajanderi*, отделив группу популяций непосредственно с северного побережья Охотского моря и более континентальной части. Следует отметить, что в ходе исследования установлено, чем большее количество выборок и изменчивых локусов включается в анализ, тем четче проявляется структура, отражающая исторические связи (Полежаева, Семериков, 2007; 2008; 2009).

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЧИВОСТЬ МАРКЕРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ВИДОВ *LARIX* ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

4.1 Полиморфизм маркеров митохондриальной ДНК. Внутрипопуляционная изменчивость. Выявлено 11 митотипов, в том числе предположительно рекомбинантной природы, которые обусловили ретикулярный характер дерева взаимоотношения митотипов (рис. 3-А). Хотя в норме митохондриальная ДНК не рекомбинирует, наследуясь клонально, все же такие довольно редкие примеры известны для растений, в том числе хвойных – в роде *Picea* (Jaramillo-Correa, Bousquet, 2005), а также *Larix* (Semerikov, Lascoix, 2003).

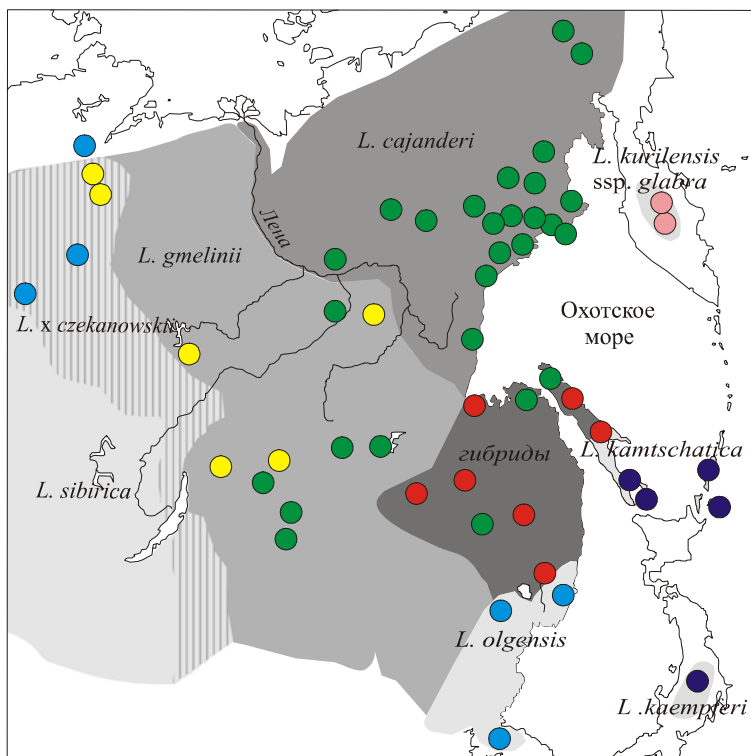
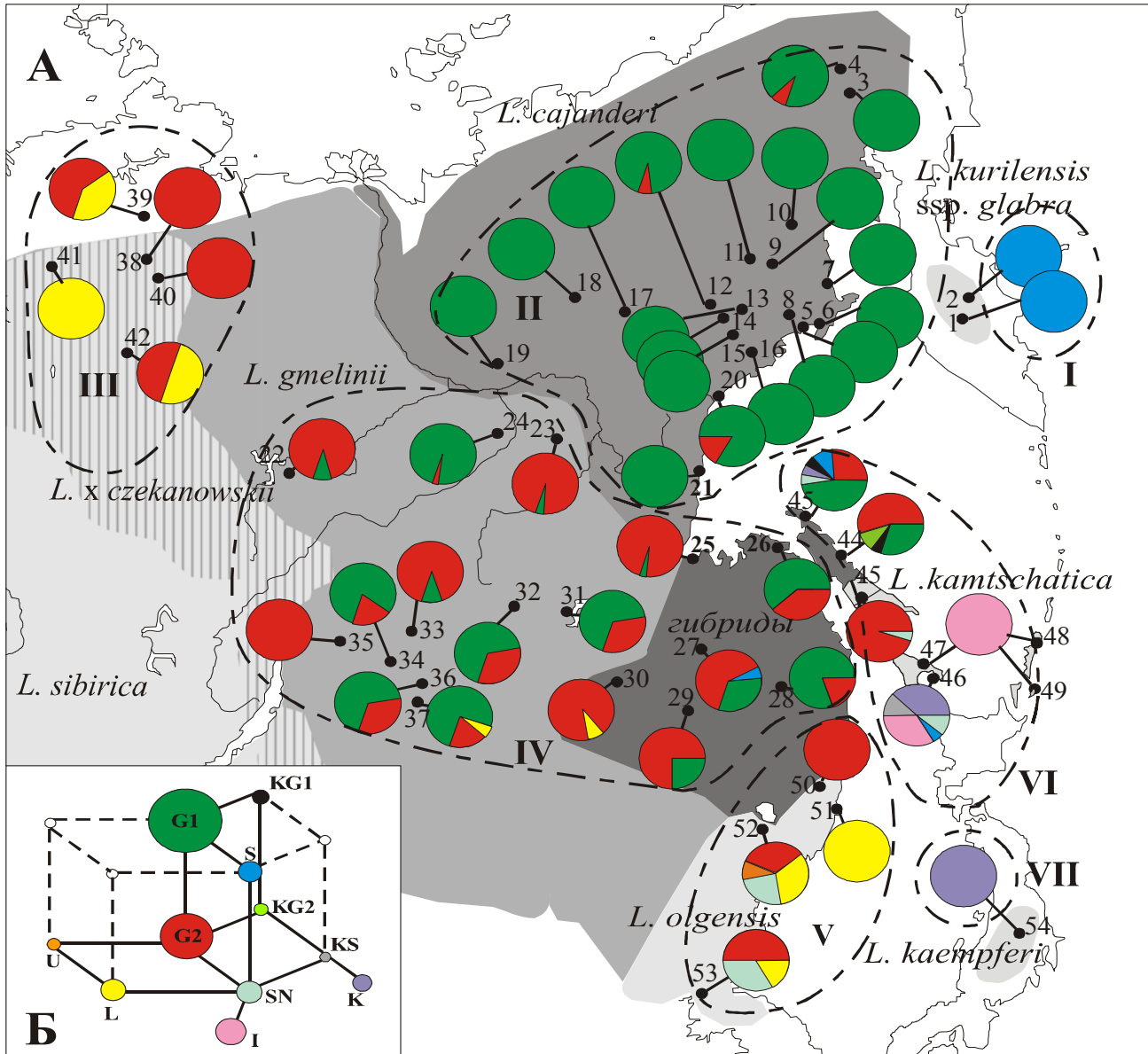
Из исследованных популяций 26 оказались фиксированными по одному митотипу, остальные 28 – полиморфными (рис. 3-Б). Наиболее изменчивыми были выборки, взятые из зоны распространения *L. kamtschatica* и *L. olgensis* и их гибридов с *L. gmelinii*, 9 и 4 митотипов, соответственно. Наименее изменчивыми (табл. 1) оказались выборки *L. kurilensis* ssp. *glabra* с Камчатки и *L. kaempferi*, у которых было обнаружено по одному митотипу. Выборки, относящиеся к *L. cajanderi*, также почти фиксированы по одному митотипу. В большинстве выборок *L. gmelinii* представлены два митотипа. Значения параметров внутрипопуляционной изменчивости в большинстве популяций невысокие: число митотипов $N_0=1-2$, эффективное число митотипов $N_e = 1-1.2$; индекс разнообразия митотипов $H = 0-0.556$. Примечательны значительные различия показателей изменчивости в выборках с северо-восточной части исследуемой территории (№ 1-20, рис. 3-Б) с низким индексом разнообразия митотипов $H = 0-0.184$ и некоторых популяций с о.Сахалин и Приморья, которые, напротив, имеют довольно высокие его значения $H = 0.546-0.812$ (№ 43, 44, 46, 52, рис. 3-Б), что, как и в случае с изменчивостью хлоропластных маркеров, объясняется историей формирования северо-восточных популяций, претерпевших значительное сокращение численности и стабильно большим эффективным размером популяций юга Дальнего Востока.

4.2 Межпопуляционная и пространственная дифференциация. Географическое распространение митотипов указано на рис. 3-Б. Несколько однородных в генети-

ческом отношении групп популяций представляют следующие виды: *L. kurilensis* ssp. *glabra* (группа I: № 1-2), *L. cajanderi* (группа II: № 3-21), гибриды между *L. sibirica* и *L. gmelinii* – *L. ×czchekanowskii* (группа III: № 38-41), *L. gmelinii* (группа IV: № 22-37), *L. olgensis* (группа V: № 50-53), *L. kurilensis* (группа VI: № 43-49) и *L. kaempferi* (группа VII: № 54). Значение параметра межпопуляционной дифференциации, вычисленного на основе частот митотипов в популяции $G_{ST} = 0.786$ аналогичного ему параметра, учитывающего также и родство митотипов (количество мутаций, на которое один митотип отличается от другого), $N_{ST} = 0.823$. Значимые различия этих коэффициентов ($N_{ST} > G_{ST}$; $P < 0.05$) указывают на наличие филогеографической структуры, т.е. разные, но филогенетически близкие митотипы имеют тенденцию сосуществовать совместно. Иерархический анализ AMOVA показал, что при учете родства митотипов около 62% всей изменчивости приходится на различия между семью видами, в то время как 20.5% приходится на изменчивость между популяциями внутри видовых групп.

Между *L. cajanderi* и остальными исследованными таксонами с учетом родства митотипов дифференциация составила 42.6%, а между *L. cajanderi* и *L. gmelinii* – 57.6%. Тест Мантела выявил корреляцию между матрицами парных генетических дистанций (N_{ST}) и географических расстояний ($r = 0.19$, $P < 0.05$), подтверждая влияние изоляции расстоянием на дифференциацию данных популяций.

Тем не менее альтернативная группировка, которая была проведена анализом SAMOVA, сопоставляющим генетические дистанции между популяциями с географическими при заданном числе групп K ($K = 2-10$), выявила, что оптимальное число групп, когда более 77% всей изменчивости распределено между ними, и при этом отсутствуют группы, содержащие только одну популяцию, равно шести. Причем группы по составу заметно отличались от выделенных на основе таксономического критерия (рис. 4). Таким образом, анализ SAMOVA выявил, что структура генетической изменчивости митохондриальных маркеров в большей степени отражает географическую структурированность изученных популяций, но не вполне совпадает с их таксономическим делением.



- Группа 1
 - Группа 2
 - Группа 3
 - Группа 4
 - Группа 5
 - Группа 6
- Рисунок 3 (вверху) –
 А: ареалы видов *Larix*, расположение проанализированных выборок и частоты митотипов; Б: дерево минимальных расстояний между митотипами

Рисунок 4 (слева) – Распределение изученных популяций *Larix* по шести группам согласно анализу SAMOVA

ГЛАВА 5. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И БИОГЕОГРАФИЯ ЛИСТВЕННИЦ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

5.1 Генетическая изменчивость и дифференциации изученных популяций

лиственниц. Исследования видов *Larix* с использованием аллозимных маркеров (Семериков, Матвеев, 1995; Потенко, Разумов, 1996; Гончаренко, Силин, 1997; Semerikov et al., 1999; Ларионова и др., 2004; Орешкова, Барченков, 2008; и др.) выявили, что уровень их генетического полиморфизма близок к другим видам хвойных (Путенихин и др., 2004). Те же тенденции прослеживаются и при использовании цитоплазматических маркеров: значения параметров их изменчивости схожи с таковыми большинства широко распространенных хвойных (Genetic diversity and population..., 2006; Comparison of genetic diversity..., 2002; Jaramillo-Correa et al., 2004; Phylogeography of a northeast Asian spruce..., 2007; Phylogeography of *Pinus*..., 2008; и др.). По сравнению с оценками популяционной дифференциации, основанной на данных изменчивости аллозимных ядерных маркеров ($F_{ST} = 0.202$; Semerikov et al. 1999) в популяциях, собранных из тех же регионов северо-восточной Азии, оценки, основанные на изменчивости мтДНК маркеров ($G_{ST} = 0.786$; $N_{ST} = 0.823$), были выше, а на основе изменчивости хпДНК маркеров ($G_{ST} = 0.144$; $R_{ST} = 0.432$) - примерно такие же. Подобная закономерность выявлена и у других видов ветроопыляемых хвойных (Decoupled mitochondrial and chloroplast ..., 2006; Phylogeography of a northeast Asian spruce..., 2007; Du et al. 2009). Разница оценок, полученных по ядерным и цитоплазматическим маркерам, может объясняться различиями в потоках генов. Поскольку мтДНК у лиственниц наследуется по материнской линии (DeVerno et al., 1993), поток генов ($Nm = 0.141$), обусловленный распространением семян, достаточно ограничен. Напротив, поток генов наследуемой по отцовской линии хпДНК, обеспечиваемый как за счет распространения семян, так и за счет разносимой ветром пыльцы (Szmidi et al., 1987), на порядок больше ($Nm = 1,8$). Ядерные гены распространяются также через пыльцу и семена, а потому имеют сходные значения потока ($Nm = 1.975$). Таким образом, изменчивость митохондриального генома оказывается более структурированной по сравнению с хлоропластным и ядерным. Совместное использование двух типов цитоплазматических маркеров позволяют получить полную картину истории расселения и таксономической дифференциации лиственниц в данном регионе.

5.2 Биogeография лиственниц Дальнего Востока России на основе структуры изменчивости мтДНК и хпДНК. Выявленная в данной работе структура изменчивости митохондриальной и хлоропластной ДНК видов *Larix* на Дальнем Востоке указывает на значительную роль плейстоценовых похолоданий в истории формирования древесной растительности на данной территории, а также на сложные процессы гибридизации и видообразования видов лиственниц, которое продолжается здесь и в настоящее время.

Larix cajanderi и рефугиум лесной растительности на побережье Охотского моря. Общепринятым является мнение, что на территории крайнего северо-востока Азии в период последнего ледникового максимума преобладала растительность открытых пространств (Adams & Faure 1997; Edwards et al. 2000). Однако не исключается существование позднеплейстоценовых рефугиумов древесной растительности в западной Берингии (Кременецкий, 1994; Last glacial maximum biomes..., 2007), в том числе вдоль осушенного шельфа на побережье Охотского моря (Ложкин, 2002; Beringia as a glacial refugium..., 2005). Преобладание на северо-востоке Азии (рис. 3-Б, группа II) митотипа G1 совпадает с областью распространения *Larix cajanderi* (Бобров, 1978, Seed collection..., 2002), не всегда признаваемой в ранге самостоятельного вида (Дылис, 1961; Farjon, 1990). Несмотря на это, анализ SAMOVA (рис. 4) не четко отделил популяции северо-востока от остальных восточносибирских, что указывает на недавнюю дивергенцию *L. cajanderi* от *L. gmelinii*. Отличие этих двух групп зафиксировали хлоропластные маркеры. На территории северо-востока распространен специфичный хлоротип H6, который не встречается за пределами Верхоянского хребта, в то время как хлоротип H72 распространен в остальной части Восточной Сибири (рис. 1-А). Ординация популяций на основе парных R_{ST} выявила среди *L. cajanderi* популяции как близкие к типичной *L. gmelinii*, так и достаточно дифференцированные от нее, в частности, группу популяций непосредственно с побережья Охотского моря (рис. 2). Особый характер лиственниц побережья Охотского моря ранее отмечался рядом авторов (Дылис, 1961; Бобров, 1978), а некоторыми даже возводился в ранг вида – *L. × ochotensis* (Колесников, 1946). Различия лиственниц Восточной Сибири и крайнего северо-востока Азии также показаны ранее по ядерным маркерам (Semerikov et al., 1999; Phylogeography of Eurasian *Larix*..., 2008). Все это подтверждает возможность выживания лиственницы северо-востока в периоды оледенений в пределах ее современного ареала. Географическое распределение митотипов и хлоротипов отражает самостоятельное историческое развитие лиственниц по разные стороны от Верхоянского хребта, покрытого во время последнего ледникового максимума ледниками (Развитие ландшафт-

тов...,1993) и выступавшего в качестве мощного барьера для потока генов, что способствовало обособленной эволюции лиственницы на крайнем северо-востоке и образованию нового вида – *L. cajanderi*.

Таксономический статус и история лиственницы Камчатки. Камчатская популяция мономорфна по митотипу S (рис. 3-Б, группа I), с низкой частотой также встречающегося на севере и юге о.Сахалин и в Хабаровском крае (популяции № 27, 43 и 46, рис. 3-Б). Одними авторами для Камчатского полуострова указывается распространение либо *L. cajanderi* (Бобров, 1978), либо *L. gmelinii* (Farjon, 1990). Другие трактуют ее как *L. gmelinii* var. *kamtschatica* (Seed collection..., 2002) или *L. kurilensis* ssp. *glabra*. Обособленный характер популяций лиственницы с Камчатки отмечался также по карриологическим (Муратова, 1993) и фенотипическим признакам (Putenikhin, 1998). В нашем исследовании SAMOVA выделил по митохондриальным данным камчатские популяции в самостоятельную группу (рис. 4). Однако присутствие митотипа S в крайних популяциях Сахалина (рис. 3-Б) указывает на его более широкое распространение в прошлом и, несомненно, близкое родство лиственниц Камчатки и Сахалина. Хлоропластные данные, напротив, указывают на родство лиственницы Камчатки с *L. gmelinii* в широком ее понимании (рис.1-А; 2). Следует отметить, что по ядерным маркерам было зафиксировано значительное отличие *L.gmelinii* var. *kamtschatica* от *L.gmelinii* из центральной Сибири, однако *L.gmelinii* var. *kamtschatica* практически не отличалась от *L. cajanderi* ($F_{ST} = 0,01(-0,11)$) (Phylogeography of Eurasian Larix..., 2008). Подобное несоответствие в распределении митохондриальных и хлоропластных гаплотипов у лиственницы на Камчатке может быть объяснено ее предположительно гибридным происхождением в эпоху, предшествующую одному из последних оледенений. Вероятно, популяции лиственницы, близкие современной *L. kamtschatica*, распространенной ныне на Сахалине и Курильских островах, обитали повсеместно на Дальнем Востоке. В ходе оледенения лиственница на севере Дальнего Востока исчезла, сохранившись на Камчатке. При наступлении благоприятных климатических условий безлесные северные территории заселились популяциями, близкими современной *L. gmelinii* s.l., которые проникли и на Камчатку, сформировав гибридный комплекс с автохтонными формами. Особенности распространения митохондриальной и хлоропластной ДНК обусловили сохранение пула матерински наследуемых митотипов автохтонных популяций и замещение пула автохтонных хлоротипов на хлоротипы пришлых популяций. Альтернативная гипотеза предполагает заселение Камчатки из рефугиума с юга Дальнего Востока через о-ва Сахалин, Хоккайдо и гряду Курильских островов. Однако

она маловероятна, так как считается, что один из самых крупных проливов Курильской гряды – Буссоль – не исчезал в период последнего ледникового максимума, и таким образом, представлял собой биогеографический барьер (Богатов, 2002). В пользу сохранения на Камчатке древесной растительности в период последнего максимума похолодания свидетельствует биогеография *Picea jezoensis* и *Abies gracilis*, чьи популяции с полуострова резко дифференцированы от близкородственных видов с юга Дальнего Востока (Potenko, Knysh, 2003; Range-wide genetic structure..., 2009; Семерикова, Семериков, 2008). Таким образом, использование двух типов цитоплазматических маркеров, имеющих контрастное наследование, позволило выявить гибридный генезис популяций лиственниц Камчатки, что было невозможным при использовании ядерных (Phylogeography of Eurasian Larix..., 2008) или только одних митохондриальных данных (Семериков, Полежаева, 2007). Генетическая обособленность популяций лиственницы Камчатки подтверждает правомерность выделения ее в самостоятельный таксон.

Лиственницы юга Дальнего Востока. Отношение лиственницы с юга Сахалина с остальными видами. По палеогеографическим реконструкциям в сартанское время оледенение отсутствовало на юге Дальнего Востока и близлежащих островах. Здесь были распространены редкостойные лиственничники и местами сохранялись элементы третичной флоры (Короткий и др., 1999; Реликтовые комплексы..., 2009). Наибольшая изменчивость мтДНК выявлена на о.Сахалин (рис. 3-Б, группа VI), для которого разными авторами указывается повсеместное распространение *L. gmelinii* var. *japonica* (Farjon, 1990) или *L. kamtschatica*, а для северной части гибриды *L. gmelinii* × *L. kamtschatica* (Дылис, 1961; Бобров, 1978). Для континентальной части юга Дальнего Востока также описываются популяции лиственниц, характеризующиеся промежуточными морфологическими признаками между *L. gmelinii*, *L. cajanderi*, *L. olgensis* и *L. kamtschatica*. Многообразие митотипов (в том числе рекомбинантных), очевидно, обусловлено процессами гибридизации при перекрывания ареалов изолированных и частично дифференцировавшихся популяций. Подобные события в период плейстоцена могли повторяться неоднократно, учитывая флуктуации климата, влияющие на размеры популяций, и исчезновение проливов между материком и о. Сахалин, а также о.Сахалин и Курильскими островами. Гибридное происхождение лиственниц на данной территории было также показано с использованием аллозимных (Semerikov et al., 1999) и митохондриальных (Semerikov, Lascoux 2003) маркеров.

Соединением в течение плейстоцена о.Сахалин в его северной части с материком (Плетнев, 2004) объясняется преобладание здесь митотипов G1 и G2 и гибридов *L.*

gmelinii × *L. kamtschatica*. Согласно этому SAMOVA объединил в одну группу популяции с северного и среднего Сахалина с материковыми популяциями (рис. 4). SAMOVA также объединил выборки *L. olgensis* из Приморья с выборками с севера Красноярского края (рис. 4), которые располагаются в зоне гибридизации *L. gmelinii* и *L. sibirica* (Круклис, Милютин, 1977; Катышев и др., 2004). Учитывая, что митотип *L. olgensis* является предковым по отношению к митотипам всех остальных видов североевразийских лиственниц и обычен у *L. sibirica* (Semerikov, Lascoux, 2003; RAPD-derived ..., 2006), подобное объединение закономерно. В выборке *L. olgensis*, взятой из места, откуда она была впервые описана А. Генри (Бобров, 1978) – бухты Ольга (51, рис. 3-Б), митотип L фиксирован. К югу от бухты Ольга на протяжении ареала *L. olgensis* частота митотипа L уменьшается, появляются даурский митотип G2, редкий митотип U (вероятно, рекомбинантный от SN и G2) (рис. 3-Б), что говорит о замещении этого древнего вида гибридами (Semerikov, Lascoux, 2003). Хлоропластные данные указывают на общий генетический пул лиственниц восточной Сибири (рис. 1; 2).

Как митохондриальные (рис. 3-Б; 4), так и хлоропластные (рис. 1-Г; 2) данные указывают на родственную связь лиственниц юга Сахалина с японской лиственницей *Larix kaempferi*. Присутствие в естественных популяциях лиственницы на Сахалине митотипа К (рис. 3-Б), а также хлоротипа Н36 (рис. 1-Г), специфичного для японской лиственницы, может быть частично объяснено лесокультурной деятельностью на юге острова. Однако присутствие митотипа К на севере острова, а также наличие рекомбинантных митотипов, содержащих признаки японской лиственницы (KG1, KG2, KS), не позволяет рассматривать это объяснение как единственное. Очевидно данный митотип, как и его производные автохтонный для Сахалина. Фиксация митотипа К на о.Хонсю, очевидно, произошла в результате эффекта основателя при проникновении лиственницы на остров на фоне резких сокращений размера популяции в межледниковьях. Так, пыльцевые данные свидетельствуют о распространении лиственницы в позднем плейстоцене по всей Японии (Igarashi, 1994), с наступлением же благоприятной обстановки, она в результате конкуренции с теплолюбивыми видами сохранилась только в горах Хонсю на больших высотах. Можно предполагать, что лиственницы Сахалина и Японских островов некогда составляли единый вид, впоследствии разделенный физическими и ценогическими барьерами.

ВЫВОДЫ

1. Уровень изменчивости микросателлитных локусов хлоропластной ДНК и полиморфных фрагментов митохондриальной ДНК лиственниц Дальнего Востока находится в пределах изменчивости этих маркеров у других видов сем. Pinaceae. Отклонения в отдельных популяциях могут быть объяснены сокращениями их численности в прошлом и процессами гибридизации.

2. Структура изменчивости митохондриальной и хлоропластной ДНК подтверждает, что в течение последнего ледникового максимума лиственница сохранялась на побережье Охотского моря, на Камчатке, в Приморье и на Сахалине.

3. Характер распределения митохондриальных и хлоропластных гаплотипов в современных популяциях лиственницы с Камчатки обусловлено процессами интрогрессивной гибридизации между популяциями, пережившими последние ледниковые максимумы на полуострове, и популяциями, заселившимися на него позже.

4. Структура изменчивости хлоропластных и митохондриальных генетических маркеров указывает на то, что Верхоянский хребет в прошлом представлял собой барьер для потока генов, определивший генетическую обособленность лиственниц северо-востока Азии и самостоятельный видовой статус восточной расы даурской лиственницы – *Larix cajanderi*.

5. Генетическое разнообразие митохондриальных маркеров лиственниц юга Дальнего Востока свидетельствует об отсутствии значительных сокращений размеров их популяций на протяжении плейстоцена и о процессах гибридизации между отдельными таксонами.

6. По обоим типам цитоплазматических генетических маркеров популяции лиственницы юга о.Сахалина обнаруживают родственные связи с *Larix kaempferi*, произрастающей ныне на о. Хонсю (Япония), указывая на возможность генетического обмена между ними в прошлом. По данным митохондриальной ДНК популяции с северного Сахалина несут генетические признаки миграций со стороны континентальных популяций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

– статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Семериков В.Л. Структура изменчивости митохондриальной ДНК лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока / В.Л. Семериков, **Полежаева М.А.** // Генетика. 2007. Т.43. №6. С 782-789.

2. **Полежаева М.А.** Генетическая изменчивость cpSSR маркеров в роде *Larix* на Дальнем Востоке / М.А. Полежаева, В.Л. Семериков // Вестник СВНЦ, 2009. №2. С. 75-84.

– публикации в других изданиях:

3. Семериков В.Л. Исследование изменчивости митохондриальной ДНК лиственниц Дальнего Востока / В.Л. Семериков, **М.А. Полежаева** // «Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика: материалы междунар. конф. Владивосток. 2006. С.234-237.

4. **Polezhaeva M.A.** Variation of mtDNA in larch species of Eastern Siberia / M.A. Polezhaeva, V.L. Semerikov // Modern achievements in population, evolutionary and ecological genetics: abstracts of international symposium. Vladivostok. 2007. -P.45.

5. **Полежаева М.А.** Генетическая изменчивость лиственниц Дальнего Востока на основе изменчивости цитоплазматических маркеров / М.А. Полежаева, В.Л. Семериков // Экология: от Арктики до Антарктики: материалы конф. молодых ученых. Екатеринбург, 2007. С.238-247.

6. **Полежаева М.А.** Изучение истории расселения лиственниц Дальнего Востока на основе изменчивости цитоплазматических маркеров / М.А. Полежаева // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: материалы VIII международной научной конференции, посвященной 275-летию с начала Второй Камчатской экспедиции (1732–1733 гг.). – Петропавловск-Камчатский, 2007. С. 159-163.

7. **Полежаева М.А.** Новые данные о плейстоценовом рефугиуме лесной растительности на побережье Охотского моря: молекулярный подход. / М.А. Полежаева, В.Л. Семериков // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы всероссийской конференции, проведенной в рамках XII съезда Русского Ботанического Общества. Петрозаводск, 2008. Часть 3, С.59-62

8. **Полежаева М.А.** cpSSR маркеры: новый подход в изучении истории древесной растительности Дальнего Востока (на примере рода *Larix*). / М.А. Полежаева. // Современное состояние и пути развития популяционной биологии: материалы X всероссийского популяционного семинара. Ижевск, 2008. С.361-363

9. **Полежаева М.А.** Изменчивость митохондриальной ДНК лиственниц Восточной Евразии. / М.А. Полежаева // Материалы V съезда ВОГиС. Москва, 2009. С. 179.

Пописано в печать 15.01.2010 г. Формат 60 × 84 1/16

Усл. печ. л. 1,0. Тираж 120 экз. Заказ № 311

Отпечатано в типографии Института экономики УрО РАН
620014, г.Екатеринбург, ул. Московская, 29. Тел.: (343) 371-16-12